

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE LA PEPSINE

Emploi de l'acide phytique pour insolubiliser
la protéine non digérée

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 21 Mai 1958

par

Henriette VILLIERS-HUIBAN
(Pharmacien)

U N I V E R S I T E D E P A R I S

FACULTE DE PHARMACIE

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE LA PEPSINE

Emploi de l'acide phytique pour insolubiliser
la protéine non digérée.

T H E S E

pour l'obtention du diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Pharmacie)

présentée et soutenue le 21 Mai 1958

par

HENRIETTE VILLIERS-HUIBAN
Pharmacien



Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

Ancien Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine
de Paris

Attachée de Recherches au Centre National de la
Recherche Scientifique

Jury { M.M. J.E. COURTOIS, Président.
 { L. DOMANGE, Assesseur.
 { P. MALANGEAU, Assesseur.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547114_0027

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. René FABRE, Doyen Membre de l'Institut
R. DELABY, Assesseur
G. CUVIER, Secrétaire Général

MM. JEANDEL, Commis - QUILLIOT, Rédacteur

Mme ESPINASSE, Rédactrice - Mlle DENY, Rédactrice
Mlle BERIL, Rédactrice

Mlle CELLIER, Commis - Mlle MORIN, Commis

Mlle BIDEAU, Commis - Mme CARON, Commis

PROFESSEURS

MM. FABRE, Membre de l'Institut Toxicologie

DELABY..... Pharmacie Chimique

JANOT Pharmacie Galénique

VALETTE..... Pharmacodynamie

BEDEL Législation, Déontologie
et Histoire de la
Pharmacie

PARIS Histoire naturelle des
médicaments simples
d'origine végétale

GUILLLOT..... Physique

GAUTIER..... Chimie analytique

Mlle LAMBIN Microbiologie

RAOUL Zoologie appliquée

COURTOIS..... Chimie Biologique

DOMANGE Chimie minérale

CRETE Botanique

M... Hygiène et Hydrologie

M... Chimie organique

MM. MORETTE.....	Professeur à titre personnel
TRUHAUT.....	id.
CAVIER	id.
MOREAU	id.
GUY	id.
GERMAN	Professeur sans chaire
PIETTE	id.

Doyen Honoraire : M. RADAIS

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE - LEBEAU
Membres de l'Institut

MM. HERISSEY - LAUNOY - FLEURY - MASCRE - PICON

MAITRES DE CONFERENCES

MM. QUEVAUVILLER	Sciences Naturelles
DAMIENS	Sciences Physiques et Chimiques
DEYSSON	Sciences Naturelles
MALANGEAU	Sciences Appliquées
FLAHAUT	Sciences Physiques et Chimiques
RENAULT J.	Sciences Physiques et Chimiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. BORY	Sérologie
BOURDON	Chimie analytique (1 ^è A.)
CORRIEZ	Physique
DESVIGNES.....	Microbiologie
HARISPE	Chimie Générale et Pharma- ceutique
LECLERC	Chimie Biologique
Mlle LONGUEVALLE	Service des Examens de Chimie
MM. MANGEOT	Chimie (4 ^è A.)
PELLERIN	Chimie analytique (2 ^è /3 ^è A.)
RENAULT M.	Chimie analytique (2 ^è /3 ^è A.)
SAVEL	Parasitologie
Mlle ROLLEN	Biologie végétale

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE et de PHARMACODYNAMIE

M. GOUTAREL.....	Chef de Travaux de Pharma- cotechnie Galénique
Mlle MORIN	Chef de Travaux de Pharma- codynamie
M. LUSINCHI.....	Chef de Travaux de Pharma- cotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Conservateur : M. GARNIER

Bibliothécaires : Mlle LAVAUD Mme KREHMER
Mme DESCRIPPES

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui nous a constamment dirigée
au cours de ces recherches,

En témoignage de notre profonde
reconnaissance.

A Monsieur le Professeur L. DOMANGE

Professeur de Chimie Minérale
à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Directeur du Laboratoire National
de Contrôle des Médicaments,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui a bien voulu examiner ce travail.

Très respectueux hommage.

A Monsieur P. MALANGEAU

Maître de Conférences à la Faculté
de Pharmacie de Paris,

Pharmacien-Chef de l'Hôpital-Psychiatrique
de Villejuif,

qui a bien voulu faire partie
de notre jury de thèse.

Avec l'expression de notre vive
gratitude.

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A MON MARI

A MON FILS

A MES FRERES ET SOEURS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE LA PEPSINE

EMPLOI DE L'ACIDE PHYTIQUE POUR INSOLUBILISER

LA PROTEINE NON DIGEREE

I N T R O D U C T I O N

La pepsine fut inscrite, pour la première fois, à la Pharmacopée Française de 1866, et a été maintenue dans toutes les éditions ultérieures. Elle figure aussi dans presque toutes les pharmacopées étrangères.

C'est un médicament qui a subi favorablement l'épreuve du temps et qui continue d'être prescrit très régulièrement. D'ailleurs, une longue liste de spécialités autorisées contiennent de la pepsine, seule, ou associée à d'autres enzymes.

La base de l'essai de la pepsine demeure la détermination de son activité protéolytique. L'essai-limite d'activité, prescrit par la Pharmacopée Française de 1866, est demeuré sous une forme un peu modifiée, dans toutes les éditions ultérieures.

Cet essai-limite a conduit les fabricants à exprimer l'activité de leurs préparations par des chiffres dénommés "Titre en pepsine". La détermination de ce titre est entrée empiriquement dans la pratique, par transposition des résultats d'un essai-limite d'activité.

Cette façon d'opérer ne donne pas entière satisfaction aux usagers; le Professeur J.E. Courtois a reçu maintes fois, à ce sujet, les doléances des fabricants de pepsines, des fabricants de spécialités où cet enzyme est incorporé, et aussi des chimistes et même du Directeur du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments. Il nous a donc conseillé d'essayer de mettre au point une technique précise et pratique d'estimation quantitative de l'activité des préparations enzymatiques de pepsine.

Les recherches effectuées au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie, ont mis en évidence les propriétés que présente l'acide phytique de précipiter les protéines en milieu acide. Les produits d'hydrolyse enzymatique, partielle ou totale, des protéines, ne sont pas insolubilisés, ce qui permet de doser les protéines non digérées. Nous avons tenté d'appliquer ces propriétés à la détermination de la fraction des protéines non digérées par la pepsine. L'édestiné a été choisie comme substrat. La comparaison des diverses techniques analytiques possibles, l'étude des modalités de la réaction, nous ont

permis de proposer une technique d'évaluation de l'activité pepsique basée sur le dosage de l'édésine non digérée qui est précipitable par l'acide phytique.

Nous avons pu également, appliquer cette technique en Chimie Clinique à la détermination de la pepsine dans le suc gastrique.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire du service de Monsieur le Professeur Jean HAMBURGER à l'Hôpital NECKER. Nous sommes heureux de lui exprimer ici notre respectueux attachement et notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Jean Emile COURTOIS, qui fut notre Maître pendant l'internat, nous a confié le sujet de ce travail. Depuis lors, il s'y est constamment intéressé, dirigeant nos recherches et nous donnant sans compter ses précieux conseils. Il a bien voulu accepter de présider le jury chargé d'examiner cette thèse. Nous désirons lui exprimer toute notre reconnaissance et tout notre respectueux dévouement.

Nous sommes très sensible à l'honneur que nous a fait Monsieur le Professeur L. DOMANGE en acceptant de faire partie du jury de notre thèse. Nous l'en remercions très respectueusement.

Nous prions Monsieur le Professeur P. MALANGEAU qui a bien voulu faire partie de notre jury d'examen, d'accepter l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

Nous désirons également présenter nos sentiments de vive gratitude à Monsieur Michel MASSON, Chef de laboratoire des Hôpitaux; nous avons travaillé auprès de lui à l'Hôpital Necker pendant deux années et il ne nous a jamais ménagé ses encouragements à poursuivre notre travail.

Monsieur René BARRE', Docteur es Sciences, a bien voulu nous faire profiter de son expérience pour l'utilisation de l'acide phytique dans nos essais; nous désirons lui en exprimer tous nos remerciements.

- PLAN DE LA PREMIERE PARTIE -

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LA PEPSINE

- A) - Origine
- B) - Place de la pepsine dans la classification des enzymes
- C) - Mode d'action
 - (Influence du pH
 - (Influence des sels
 - (Influence de la température
 - (Protéines attaquées
- D) - Pepsine du Codex 1949
- E) - Méthodes antérieures de mesure de l'activité
 - (Méthode de Mett
 - (Méthode de Grützner
 - (Méthode de Brücke
 - (Techniques des Pharmacopées

CHAPITRE II

LA PEPSINE DU SUC GASTRIQUE

- A) - Généralités
- B) - Dosage

Première partie - Chapitre I -

Généralités sur la pepsine

A) - Origine -

La pepsine est un enzyme protéolytique, constituant la principale substance du suc gastrique. Elle a été découverte par Schwann en 1836 mais, bien auparavant, Réaumur et Spallanzani avaient démontré l'existence dans le suc gastrique d'une substance capable de digérer la viande; plus tard, Pavlow a étudié le mécanisme de cette sécrétion au moyen de fistules artificielles chez les animaux.

Dès le début de l'enzymologie, les thérapeutes envisagent d'administrer des enzymes par voie buccale en vue de suppléer à l'insuffisance des sécrétions digestives.

C'est ainsi que l'édition 1858 du répertoire de Pharmacie de Dorvault mentionne déjà une poudre "nutrimentive", un sirop et des pastilles de pepsine.

Ces préparations pharmaceutiques sont recommandées par Corvisart et Boudault "lorsque les digestions sont laborieuses, imparfaites ou impossibles".

La pepsine est extraite de la muqueuse gastrique du porc par macération ou par autolyse de cette muqueuse. En 1929, Northrop parvint à obtenir l'enzyme sous forme cristallisée; il précipita une solution impure de pepsine

par du sulfate de magnésium à demi-saturation, en solution sulfurique diluée. Le précipité, lavé avec une solution de sulfate de magnésium fut remis en solution au moyen de la soude 0,5 N; après une nouvelle précipitation par acidification sulfurique, il laissa reposer pendant quelques heures à la température de 0° C. Le précipité fut à nouveau dissous dans la soude diluée à la température de 45° C. La pepsine cristallisa lentement au cours du refroidissement.

Les cristaux obtenus sont optiquement actifs et possèdent tous les caractères des protéines; soumis à des cristallisations fractionnées répétées; ils ne subissent aucun changement, tant dans leurs propriétés chimiques que physiques. C'est ainsi qu'au cours de ces cristallisations, la teneur en azote et le pouvoir rotatoire ne sont pas modifiés.

La pepsine a été aussi préparée à partir de la muqueuse gastrique d'autres animaux tels que le saumon (Norris et coll. 65), le boeuf (Northrop 66), le poulet (Herriott et coll. 45), etc

Dans l'estomac, la pepsine est sécrétée par les cellules principales de la région fundique, à l'état de pepsinogène. Le pepsinogène est un proenzyme, que l'acidité du milieu stomacal transforme en pepsine. Cette transformation a lieu à des pH inférieurs à 6. Le pepsinogène est

stable à pH 8; cette propriété permet le dosage de pepsinogène en présence de l'enzyme; en effet, en acidifiant le proenzyme à pH 2, on le transforme complètement en pepsine. Dans une solution des deux corps, il suffit donc de procéder à deux déterminations de pepsine, l'une avant, l'autre après acidification, pour obtenir par différence, l'équivalence de pepsinogène.

L'on considère habituellement (Polonovski 69) que le suc gastrique contient environ 1 milligramme de pepsine cristallisée Northrop, par millilitre.

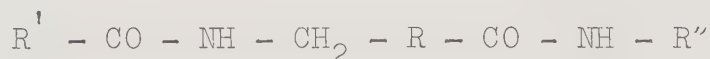
B) - Place de la pepsine dans la classification des enzymes -

Oppenheimer, en 1923, classe les protéinases en peptidases d'une part, et protéases d'autre part. Les premières hydrolyseraient, selon lui, les liaisons peptidiques, les secondes possèderaient seulement une "action désagrégeante". Mais, à la suite des travaux de Willstätter et de Grassmann, il fut admis que les enzymes protéolytiques ne sont pas uniquement des agents de désagrégation, mais aussi des agents hydrolytiques, scindant les liaisons peptidiques avec déblocage d'un nombre égal de groupements carboxyliques et aminés.

Grassmann propose donc de classer les enzymes protéolytiques en protéinases et en peptidases, se distinguant ainsi : les protéinases agissent sur les grosses molécules tandis que les peptidases hydrolysent les polypeptides.

La trypsine, la pepsine et les cathepsines seraient des protéinases admettant de plus, une spécificité de pH : la pepsine agit sur les protéines en milieu acide; celles-ci se comportent comme des "cations protéiques"; l'action de la trypsine, au contraire, s'exerce sur des "anions protéiques", en milieu alcalin; quant aux cathepsines, elles agissent en milieu neutre.

Bergmann a montré que la pepsine peut scinder les liaisons peptidiques dans des polypeptides de faible poids moléculaire ne possédant pas de groupements COOH et NH₂ libres, aux extrémités de la chaîne et correspondant au schéma :



D'autres protéinases peuvent, comme la pepsine, agir dans certains cas, sur des protéines de faible poids moléculaire. Il est donc préférable de classer ces enzymes selon les points de la molécule où sont rompues les liaisons peptidiques et d'adopter la définition de K. Linderström-Lang: les protéases qui agissent sur les liaisons terminales de la molécule, sont des exopeptidases, c'est le cas des aminopeptidases et des carboxypeptidases, tandis que l'action des endopeptidases s'étend, à la fois, aux liaisons peptidiques centrales et terminales.

La pepsine appartient à ce dernier groupe, elle hydrolyse un grand nombre de protéines animales ou

végétales, qu'elle transforme en produits dénommés conventionnellement albumoses et peptones. Son action s'exerce seulement, en milieu acide, le pH optimum étant voisin de 2; à pH 4, son activité devient très faible. Dans le suc gastrique, le pH optimum est obtenu par l'acide chlorhydrique, mais in vitro, ce dernier peut être remplacé par d'autres acides, tels que les acides bromhydrique, sulfurique, phosphorique, oxalique, citrique, etc

C) - Mode d'action -

Influence du pH - L'acidité est un facteur essentiel pour l'action de la pepsine. L'optimum d'action est obtenu pour les solutions ayant un pH compris entre 1,7 et 2, quel que soit l'acide mis en jeu.

Il est impossible, à priori, de dire quelle est la dose d'acide la plus favorable. Cette dose est essentiellement fonction de la pureté de la pepsine employée et des substances contenues dans le liquide de réaction. Les pepsines d'autodigestion, riches en peptones jouant le rôle de corps tampons, demandent l'adjonction d'une plus forte dose d'acide qu'une pepsine de macération.

Les bases et les sels alcalins, inhibent l'action de la pepsine. En effet, si l'on neutralise une solution acide de pepsine, l'activité de cette dernière disparaît; elle réapparaît au cours d'une nouvelle acidification, mais

il y a toujours diminution de l'activité enzymatique, au cours de ces diverses opérations.

Influence des sels - Les sels neutres, tels que le chlorure de sodium, le bromure de potassium et le sulfate de magnésium agissent peu sur la pepsine et ne sont inhibiteurs qu'à dose élevée. Les solutions faiblement alcalines (bicarbonate de sodium) retardent son action. Cependant, l'addition de benzoate de soude à la pepsine n'altère pas le pouvoir protéolytique (benzoate ajouté pour faciliter les injections) Borsalino (14). Les matières colorantes l'entravent considérablement : c'est le cas de l'auramine, du violet de méthyle, du bleu de méthylène, du vert malachite, de l'éosine (Sato 72).

Influence de la température - La température joue un rôle important dans l'activité de l'enzyme. Les auteurs ne sont pas d'accord sur la température optimum. Selon Petit, elle serait de 50° , et selon Hammarsten de 40° .

Protéines attaquées - Nous avons indiqué précédemment, que la pepsine agit aussi bien sur les liaisons peptidiques des grosses molécules que sur celles des peptides synthétiques. Son action sur les protéines conduit même à la libération de certains amino-acides, tels que la L-tyrosine et la L-phénylalanine.

Bergmann et Zervas (12) ont, dans leurs travaux, précisé l'action de la pepsine. Ils ont préparé synthétiquement des substrats de faible poids moléculaire. Tous ces substrats, de composition parfaitement connue, renfermaient soit de la phénylalanine, soit de la tyrosine dans leur molécule. Les auteurs ont ainsi étudié l'hydrolyse par la pepsine des substrats suivants; (la double flèche verticale indiquant la liaison scindée par l'enzyme) :

Carbobenzoxo - L - glutamyl - $\updownarrow$ L - tyrosine;

Carbobenzoxo - L - glutamyl - $\updownarrow$ L - phénylalanine;

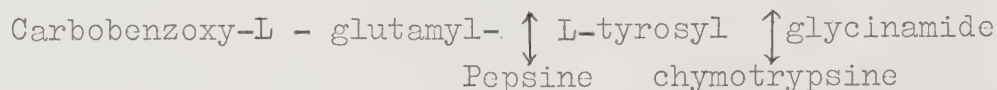
Carbobenzoxo - L - glutamyl - $\updownarrow$ L - tyrosinamide;

Glycyl - L - glutamyl - $\updownarrow$ L - tyrosine;

Carbobenzoxo - L - glutamyl - $\updownarrow$ L - tyroxyglycine;

Ils ont observé que lorsque l'un des acides aminés indispensables, phénylalanine ou tyrosine, se trouve à l'extrémité de la chaîne, l'hydrolyse est plus rapide et l'acide aminé est libéré. Ainsi, la molécule de carbobenzoxo - L-glutamyl - L-tyrosine est scindée, par la pepsine, au niveau de la liaison des radicaux glutamyl et tyrosyl du peptide. Ainsi s'explique l'apparition de tyrosine au cours de l'hydrolyse pepsique. L'enzyme agit, le plus souvent, sur la liaison peptidique qui implique le groupement NH_2 de l'acide-amino aromatique.

Si l'on fait agir sur un même peptide synthétique deux enzymes, leur action ne se porte pas sur les mêmes liaisons: la carbobenzoxyl-L - glutamyl-L - tyrosyl-glycinamide est hydrolysée par la pepsine et la chymotrypsine suivant le schéma ci-dessous :



Si l'on supprime le groupement carbobenzoxyl, on arrête l'hydrolyse par la pepsine.

La pepsine est sans action sur les protamines qui ne contiennent ni tyrosine, ni phénylalanine; elle n'agit pas davantage sur les kératines et les mucines, mais elle attaque le collagène du tissu conjonctif. Toutefois, d'après Neuman, le collagène purifié ne serait pas attaqué.

L'action de la pepsine s'exerce aussi sur l'insuline (Butler et coll. 19-20) en libérant 12 à 20 % de l'azote total.

La zéine est hydrolysée par la pepsine (Laine 57); on trouve dans l'hydrolysat, une quantité abondante de tyrosine.

Huguet (51) étudiant l'hydrolyse pepsique de la caséine, a montré que l'enzyme libère certains amino-acides

tout au début de l'hydrolyse; d'autres sont détachés plus lentement, d'autres enfin, ne sont pas détachés de la molécule protéique. Les acides aminés aromatiques terminaux sont tout d'abord libérés : tyrosine, phénylalanine puis le glycocolle, l'alanine, la leucine; plus tard apparaissent l'acide glutamique, la sérine; enfin, de nouvelles ruptures libèrent beaucoup plus tardivement la valine et la thréonine. L'action de la pepsine sur la caséine est incomplète; en effet, l'acide aspartique, la lysine, l'arginine, d'autres acides aminés, intervenant dans la constitution de la caséine, ne sont pas libérés.

Enfin, la pepsine hydrolyse l'ovalbumine, la globine de cheval (Desnuelle et coll. 29).

On a essayé de déterminer les groupements actifs de la molécule. Par action du cétène sur une solution aqueuse de l'enzyme, à pH 5-6 Herriott et Northrop (46) ont pu isoler trois dérivés acétylés cristallisés. Le premier, qui a la même activité que la pepsine initiale, comprend trois ou quatre groupes acétyle bloquant des amines primaires. Le second, contient de 7 à 11 groupes acétyle et ne possède plus que 60 % environ, de l'activité du premier. Une partie de ces groupes acétyle est fixée sur les OH phénoliques libres de la tyrosine; par hydrolyse acide légère, à froid, ceux-ci se détachent seuls de la molécule acétylée; le produit recouvre alors toute son activité. Le troisième produit polyacétylé (plus de 20 groupements) n'a plus que 10 % de l'activité

initiale. Ainsi donc, si l'on bloque les fonctions aminées par acétylation, on n'agit pas sur l'activité de l'enzyme; mais il est indispensable que les groupements COOH et surtout les fonctions phénol de la tyrosine soient libres. L'acétylation par le cétène, de ces hydroxyles phénoliques inhibe 40 % de l'activité pepsique; l'hydrolyse régénère l'activité initiale.

D - Pepsine du Codex 1949 -

La dernière édition de la Pharmacopée Française indique que la pepsine est un enzyme protéolytique, extrait par macération ou par autolyse acide, de la muqueuse de porc et qu'on prive d'une partie des peptones qui l'accompagnent par des traitements physico-chimiques appropriés. Elle se présente sous forme de paillettes translucides ou opaques de couleur jaune, ou sous forme de poudre blanc jaunâtre; ces diverses formes dépendent du mode d'évaporation et de dessiccation.

La pepsine présente une odeur et une saveur spéciales. Elle est soluble dans l'eau et dans l'alcool faible, (titrant 20 à 30°) en donnant une solution acide, limpide ou légèrement opalescente; elle est insoluble dans l'alcool fort et dans la plupart des autres solvants organiques.

Le Codex prescrit la recherche de dextrines ou

d'amidon par le réactif iodoioduré et l'évaluation de l'activité protéolytique par digestion à 50° C de la fibrine desséchée du porc. La pepsine doit protéolyser 50 fois son poids de fibrine sèche, ce qui correspond à 200 fois son poids de fibrine essorée fraîche; on exprime ces résultats en disant que la pepsine possède le titre 200. Pour amener une pepsine trop active au titre exigé, on peut l'additionner de lactose.

La pepsine doit être conservée dans des flacons bien bouchés, à l'abri de l'air et de la lumière. Elle est incompatible avec les tanins, l'alcool fort, les sels métalliques, les autres enzymes qui la détruisent ou qu'elle détruit suivant la réaction du milieu.

On emploie très fréquemment un mélange de pepsine et d'amidon (pepsine amylacée) ou de pepsine et de lactose (pepsine lactosée). Les mélanges doivent correspondre à un titre protéolytique de 80.

E - Méthodes antérieures de mesure de l'activité -

Plusieurs méthodes ont été proposées pour mesurer l'activité protéolytique de la pepsine. Les unes sont basées sur les variations des propriétés physiques des liquides de digestion. C'est ainsi que l'on peut observer les variations de viscosité, de pouvoir rotatoire, etc.....

D'autres méthodes étudient la quantité de substance digérée en un temps donné :

- L'épreuve de Mett utilise comme substrat de petits cylindres d'ovalbumine coagulée; on mesure la longueur du cylindre, avant et après hydrolyse par la pepsine. Les longueurs dissoutes dans le même temps sont entre elles comme les racines carrées des quantités de pepsine mises en oeuvre. Le point délicat de ce dosage consiste dans la préparation des tubes d'albumine.

- Méthode de Grützner - Cette technique utilise comme substrat de la fibrine colorée par du picrocarminate d'ammonium. Au fur et à mesure de la digestion de la fibrine, cette dernière abandonne sa matière colorante; on apprécie au colorimètre la quantité dissoute et on compare avec une pepsine type.

- Procédé Brücke - On prépare des dilutions de deux pepsines telles que : P, $\frac{P}{2}$, $\frac{P}{4}$, $\frac{P}{8}$, $\frac{P}{16}$ et P', $\frac{P'}{2}$, $\frac{P'}{4}$, $\frac{P'}{8}$, $\frac{P'}{16}$, on les additionne d'une même quantité d'acide chlorhydrique à 1 %. Ces dilutions sont mises en contact avec de petits cubes d'albumine de même poids. On porte le tout à l'étuve et, au bout d'un certain temps, on cherche dans chaque série, le flacon contenant le cube d'albumine complètement digéré.

- Méthode de Anson (3) - Cette technique consiste à opposer à une solution chlorhydrique d'hémoglobine, la solution de pepsine à étudier, dans des conditions expérimentales déterminées. Après hydrolyse, l'enzyme est inactivé par l'acide trichloracétique et, dans le filtrat, en dose la tyrosine libérée au cours de la protéolyse, par la méthode colorimétrique de Folin et Ciocalteu (réduction par les fonctions phénoliques de la tyrosine du mélange des acides phosphomolybdique et phosphotungstique).

- C o d e x - Il n'y a pas de dosage vrai de la pepsine au Codex, mais seulement un essai-limite conventionnel, destiné à déterminer le minimum d'activité dans des conditions bien définies : une partie de pepsine doit protéolyser 200 parties de fibrine essorée correspondant à 50 parties de fibrine desséchée. Le Codex 1937 ajoute qu'une telle pepsine possède au minimum 200 unités arbitrairement définies par les conditions expérimentales. Ces dernières ne sont pas exemptes de critique. En effet, depuis l'édition du Codex 1884, l'essai de la pepsine s'effectue à la température de 50° C. Cette température élevée présente beaucoup de risques de dénaturation de l'enzyme, surtout lorsque l'on essaie des préparations partiellement purifiées. Les impuretés associées accroissent en effet les risques de dénaturation.

De plus, l'essai du Codex s'effectue dans un milieu très faiblement tamponné, conduisant à un pH final de 3,4. Le Codex de 1886 préconisait l'acide lactique pour assurer l'acidité indispensable; depuis, l'acide chlorhydrique lui a été substitué; enfin, les impuretés associées à la pepsine peuvent modifier le pH, ce qui rend malaisé l'obtention d'un pH final de 3,4.

Les utilisateurs de pepsine ont transformé ce qui était, en fait, un essai qualitatif en essai quantitatif, et l'on trouve sur le marché français, des pepsines dont le titre varie entre 100 et 1.000.

En outre, les essais prescrits par les diverses pharmacopées diffèrent à la fois par leurs techniques et par le mode d'expression de leurs titres; nous avons donc tenté de mettre au point, une méthode simple et pratique d'appréciation de l'activité des pepsines commerciales et, secondairement, de l'activité du suc gastrique chez l'homme.

Nous avons rassemblé dans le tableau I, les modes d'essai de la pepsine d'après diverses pharmacopées.

- Essais de pepsines dans diverses pharmacopées -

:Nation de la : :Pharmacopée :	:Substrat :	:Température: :de l'essai :	:Durée d'hy- :drolyse :	:Caractéristiques de :l'essai :
:Allemagne :Ed. 1956	:ovalbumine:	: 45° C :	: 3 heures :	:Il ne doit rester en :suspension qu'une pelli- :cule blanc jaunâtre
:Belgique :Ed. 1930	:ovalbumine:	: 50° C :	: 2 heures :	:La pepsine digère au :moins 250 fois son :poids d'albumine
:Etats-Unis :Ed. nouveau :formulaire : 1955	:ovalbumine:	: 52° C :	: 2 h. 30 :	:La pepsine digère au :moins 3.000 fois et au :plus 3.500 fois son :poids d'ovalbumine
:Grande- : Bretagne :Ed. 1954	:ovalbumine:	: 50-52° C :	: 4 heures :	:La pepsine doit dissou- :dre au moins 2.500 fois :son poids d'ovalbumine :coagulée
:Italie :Ed. 1929	:ovalbumine:	: 38-40° C :	: 2 heures :	:On doit obtenir un li- :quide limpide avec quel- :ques flocons gélatineux
:Norvège :Ed. 1934	:ovalbumine:	: 45° C :	: 2 heures :	:On doit obtenir un :liquide clair
:Suède :Ed. 1946	:ovalbumine:	: 40-45° C :	: 2 heures :	:On doit obtenir un :liquide clair
:Suisse :Ed. 1949	:caséine :	: 40° C :	: 1 heure :	:Le trouble de la solu- :tion de caséine après :digestion, doit être au :plus égal à celui du :liquide de comparaison
:U.R.S.S. :Ed. 1934	:ovalbumine:	: 40-47° C :	: 4 heures :	:On doit obtenir une :dissolution totale de :l'ovalbumine avec seule- :ment quelques flocons :jaunâtres à demi-trans- :parents, non dissous

Comme le montre ce tableau, les diverses pharmacopées ne procèdent qu'à des tests limites d'activité minimum, le plus souvent avec l'ovalbumine dénaturée comme substrat. Aucune de ces pharmacopées n'exige une détermination précise et plus ou moins relativement quantitative de l'activité pepsique.

- Première partie - Chapitre II -

La pepsine du suc gastrique

A) - G é n é r a l i t é s -

On entend par suc gastrique, l'ensemble des produits de sécrétion des glandes de l'estomac. La quantité de suc sécrété pendant 24 heures est variable et dépend de diverses circonstances. Au repos et à jeun, l'estomac de l'homme sécrète environ 8 à 15 ml de suc par heure. Sa composition, son acidité et son pouvoir digestif varient aussi dans de grandes proportions.

La fonction digestive du suc gastrique dépend, en grande partie, de la présence de pepsine. Les cellules principales des glandes fundiques sécrètent du pepsinogène qui se convertit en pepsine sous l'action de l'acide chlorhydrique sécrété par les cellules pariétales des mêmes glandes. Le pH optimum de la pepsine est situé entre 1,5 et 2. Cependant, on a vérifié expérimentalement (Houssay 50) que, pendant les deux heures qui suivent un repas, le pH du contenu gastrique de par l'action tampon des protéines, n'arrive qu'à des chiffres de 5 à 6. A ce pH, la pepsine est inactive. On a découvert, dans le suc gastrique, un autre enzyme protéolytique qu'on a identifié comme étant une cathopsine, dont le pH optimum d'action est de 3 à 5. Selon Buchs (16-18), cathopsine et pepsine sont deux enzymes équivalents dans le suc gastrique. Au début de la digestion, quand le chyme

gastrique a une acidité correspondant à des pH de 3 à 5, la cathepsine agit seule; c'est seulement après la troisième heure que le pH est suffisamment abaissé pour permettre à la pepsine d'intervenir. La cathepsine commence donc la protéolyse dans l'estomac et la pepsine la termine.

Remarquons aussi que, chez le nourrisson, le pH du suc gastrique est beaucoup plus élevé que chez l'adulte. Il varie en effet, de 5,8 à la naissance à 4,4 au dixième mois. Ces valeurs sont très éloignées du pH optimum d'action de la pepsine, ce qui semblerait exclure chez les très jeunes enfants, la possibilité d'une digestion pepsique.

Dans l'estomac, l'hydrolyse des protéines par la pepsine n'est pas poussée très loin. Les produits de cette hydrolyse sont encore des molécules assez grosses de nature polypeptidique. On estime que le pourcentage des liaisons rompues par la pepsine dans une protéine, est de 10 à 20 p. 100. En définitive, la digestion des protéines par la pepsine du suc gastrique aboutit à une solubilisation de ces protéines. Cependant, le contenu gastrique renfermerait, d'après les travaux de Merlevede et coll. (61) 12 amino-acides qui sont : la leucine, la lysine, la phénylalanine, la glycine, l'histidine, l'alanine, la tyrosine, la sérine, l'acide glutamique, la citrulline, la valine, et la glutamine.

B) - D o s a g e -

L'estimation quantitative de la pepsine du suc gastrique est délicate. Les déterminations portent sur des liquides extraits de l'estomac par tubage, soit à jeun, soit après une excitation constituée par un repas d'épreuve ou par une injection sous-cutanée de chlorhydrate d'histamine.

La plupart des traités généraux de Biologie clinique publiés en France au cours des vingt dernières années, préconisent pour le dosage de la pepsine dans le suc gastrique, des techniques basées sur la méthode de Mett : réduction du volume de filaments d'ovalbumine coagulée, après action de la pepsine. Ces techniques fournissent des indications sommaires, qualitatives, mais ne permettent pas d'apprécier quantitativement, de façon précise, l'activité de l'enzyme. Elles exigent, de plus, une longue durée d'incubation (24 heures en général) du suc gastrique avec l'ovalbumine.

D'autres substrats ont été utilisés : la caséine a été employée par Northrop (67) mais les différentes caséines, même préparées très soigneusement, donnent des substrats qui montrent de grandes variations quand on les oppose à une même quantité de pepsine. Ege et Menck-Thygesen (32) préfèrent les protéines du lait, de composition plus régulière.

D'autres techniques ont été préconisées, au cours de ces dernières années, pour déterminer la pepsine du suc gastrique, mais elles ne semblent pas, jusqu'ici, d'un usage courant dans les laboratoires français de chimie clinique.

1) Riggs et Stadie (71) utilisent la méthode suivante : une suspension homogène d'ovalbumine coagulée sort de substrat. Afin de standardiser la suspension, les auteurs procèdent à un dosage d'azote et ramènent le taux de ce dernier, par dilution, à 0,5 mg par ml. de suspension. Le substrat additionné de quelques gouttes de merthiolate, se conserve 2 mois à la température de -10°C . L'hydrolyse de l'ovalbumine par le suc gastrique, se fait en un temps très court (cinq minutes) à la température de 30°C , à pH 1,6. Au fur et à mesure de la protéolyse, l'opacité de la suspension diminue; on procède à un dosage photométrique de l'opacité avant et après hydrolyse.

2) D'autres techniques sont basées sur la libération de tyrosine au cours de la digestion pepsique; ce sont, en général, des adaptations de celle préconisée par Anson et Mirsky en 1933 (4). Ces auteurs soumettent l'hémoglobine à l'action de la pepsine; après élimination de la protéine non digérée par l'acide trichloracétique, la tyrosine libérée au cours de l'hydrolyse, est dosée colorimétriquement, dans le filtrat, par le réactif des phénols de Folin et Ciocalteu.

3) Bock (13) a décrit récemment une technique de ce type, en substituant à l'hémoglobine, comme substrat, les protéines du sérum humain, desséchées et pulvérisées. L'hydrolyse est interrompue par l'acide trichloracétique; on dose dans le filtrat les produits provenant de la dégradation de la protéine par le réactif de Folin et Ciocalteu, au spectrophotomètre de Beckman, longueur d'onde 740 m μ . Bock utilise une pepsine de référence, afin d'évaluer l'activité pepsique du suc gastrique en mg. de pepsine standard.

4) Enfin, les amino-acides cycliques libérés au cours de l'hydrolyse, peuvent être dosés par spectrophotométrie dans l'ultra violet, comme l'a proposé R. Barré (5).

PLAN DE LA DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I

Utilisation de l'acide phytique pour insolubiliser les protéines non digérées par la pepsine.

- A) Généralités sur l'acide phytique
- B) Action de l'acide phytique sur les protéines
- C) Choix d'un substrat : l'édectine

CHAPITRE II

Essais préliminaires d'orientation.

Vérification de la précipitation intégrale de l'édectine par l'acide phytique.

CHAPITRE III

Protocole opératoire des essais systématiques.

- A) Réactifs employés
- B) Conditions de l'hydrolyse enzymatique
- C) Déterminations sur le précipité acide phytique-édectine
 - a) Détermination de l'azote total
 - b) Dosage du phosphore
 - c) Détermination de l'édectine non hydrolysée
- D) Déterminations sur le liquide surnageant
 - a) Dosage de la tyrosine
 - b) Dosage de l'acide phytique en excès

CHAPITRE IV

Comparaison de l'évolution de la réaction suivant les différentes techniques.

CHAPITRE V

Etude de l'hydrolyse par la pepsine en fonction du temps.

CHAPITRE VI

Eléments de choix d'un protocole analytique.

Influence de la dose de pepsine sur la vitesse d'hydrolyse

Recherche de la cathepsine éventuellement associée à la pepsine.

CHAPITRE VII

Eléments d'un choix du mode d'expression des résultats.

- DEUXIEME PARTIE - CHAPITRE I -

Utilisation de l'acide phytique pour insolubiliser les protéines non digérées par la pepsine -

A) GENERALITES SUR L'ACIDE PHYTIQUE -

La structure de l'acide phytique ou phytinique a provoqué de nombreuses recherches et l'établissement de sa formule a suscité de nombreuses discussions. Nous ne citerons que pour mémoire la formule d'Heubner (47) et celle de Starkenstein (73). A la suite des travaux les plus récents, deux formules ont retenu l'attention : celle d'Anderson (1) et celle de Neuberg (63-64).

D'après Anderson, l'acide phytique est un ester hexamonoorthophosphorique de l'inositol et doit posséder 12 fonctions acides : 6 fonctions acides fortes comparables à la fonction la plus acide de l'acide orthophosphorique et 6 fonctions acides faibles comparables à la fonction acide moyenne de l'acide orthophosphorique.

D'après Neuberg, l'acide phytique serait un ester de l'acide trihydroxyphosphorique de Sanfourche et possèderait 18 fonctions acides.

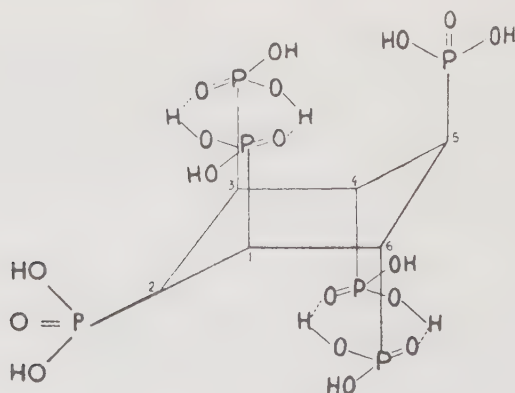
A l'heure actuelle, on admet que les inositols existent essentiellement avec la conformation dite "en forme de chaise". L'acide phytique résulte de l'estérification

par l'acide orthophosphorique de chaque hydroxyle du mésoinositol. Barré, Courtois et Wormser (10-23-77) ont été amenés, afin de préciser sa structure, à déterminer les courbes de titration et de conductivité des solutions de phytate additionnées d'un acide d'une part, ou de l'acide phytique libre progressivement neutralisé par la potasse d'autre part.

Ces courbes indiquent que l'acide phytique possède :

- quatre fonctions acides très faibles de pK voisin de 9,7;
- deux fonctions acides faibles de pK voisin de 6,3 comparables à la deuxième fonction de l'acide orthophosphorique;
- six fonctions acides fortes de pK voisin de 1,84 comparables à la première fonction acide de l'acide orthophosphorique.

Ces expériences conduisent à envisager pour l'acide phytique la structure suivante :



L'acide phytique est très largement distribué chez les végétaux, où il est localisé particulièrement dans les tubercules, bulbes, rhizomes et surtout dans les graines (Cultrera 28). Dans ces organes, l'acide phytique ne se trouve pas à l'état libre, mais sous forme de sels (sels de calcium, de magnésium, de fer, de manganèse) et sous forme de combinaisons acide phytique-protéines. L'existence de ces dernières rend très délicate l'extraction complète de l'acide phytique à partir des tissus végétaux. De nombreux auteurs ont proposé dans ce but diverses solutions acides : l'acide chlorhydrique et l'acide trichloracétique ont été particulièrement employés à différentes concentrations. Tous deux possèdent un inconvénient : à chaud, l'acide trichloracétique solubilise à côté de l'acide phytique, l'acide nucléique. Quant à l'acide chlorhydrique, au-dessous de pH 2,0 il se substitue progressivement à l'acide phytique pour salifier les groupements basiques de la protéine. Celle-ci se trouve donc resolubilisée et perturbe les opérations ultérieures d'extraction. Barré (6) a proposé de séparer d'abord les combinaisons acide phytique-protéine des tissus végétaux, puis de traiter ces combinaisons par des solutions d'acide trichloracétique : la protéine est insolubilisée et l'acide phytique passe en solution.

L'acide phytique peut être obtenu par synthèse. C'est ainsi que Posternack (70) a isolé un ester phosphorique de caractères identiques à ceux de l'acide phytique, en

chauffant un mélange d'inositol et d'acide phosphorique dans certaines proportions, en présence d'anhydride phosphorique.

L'acide phytique se présente sous la forme d'un liquide sirupeux, jaune transparent, soluble dans l'eau et dans l'alcool, insoluble dans l'éther, le chloroforme. Bien que sa constitution rappelle celle d'un ester hexaphosphorique d'hydrate de carbone, il ne réduit pas la liqueur de Fehling (Guillemet 42).

Il présente certaines réactions de précipitation de l'ion phosphorique : c'est ainsi qu'avec le nitrate d'argent il donne un précipité blanc; de même avec la mixture magnésienne le réactif molybdique et l'acétate de calcium. Avec le chlorure ferrique, il donne un précipité blanc ivoire, insoluble en milieu faiblement acide.

Les sels de l'acide phytique sont bien connus : phytates de calcium - de fer - de magnésium - de quinine - de sodium Ils sont obtenus par double décomposition, ou par saturation de l'acide à l'aide des bases correspondantes.

On utilise surtout ses combinaisons avec les sels de calcium et de magnésium, connues sous le nom d'inositohexaphosphates; elles sont commercialisées en pharmacie sous divers noms de spécialités.

B - ACTION DE L'ACIDE PHYTIQUE SUR LES PROTEINES -

L'acide phytique est un réactif précipitant des protéines. Si l'on ajoute de l'acide phytique à une protéine dialysée, il apparaît un précipité dans lequel la protéine est associée à l'acide phytique; ce précipité est très insoluble de pH 2,0 à pH 5,0 mais se redissout en milieu très acide ou alcalin.

Courtois et Barré ont en 1949 (24) constaté qu'en milieu acide, l'acide mésoinositohexaphosphorique précipite les fractions protéiques de la graine d'amandier; par contre, il n'apparaît pas de précipité avec les peptones. Plus tard, ces mêmes auteurs (6-7-8-9-11-25) ont étudié le mécanisme de la précipitation des protéines globulaires par l'acide phytique. Ce dernier possède six fonctions acides fortes comparables à la première fonction acide de l'acide orthophosphorique; chacune d'elles s'unit à un groupe basique de la protéine, il en résulte une modification de l'architecture de l'édifice protéique qui se traduit par une précipitation de la combinaison acide phytique-protéine. En milieu neutre ou faiblement alcalin, ceci ne se produit pas car toutes les fonctions acides fortes ou moyennes de l'acide phytique se trouvent salifiées. En milieu faiblement acide, les fonctions acides sont progressivement libérées du phytate et se combinent aux groupes basiques de la protéine. Ces groupes appartiennent presque exclusivement à l'arginine, l'histidine, la lysine, dont un des groupements basiques se trouve inclus dans une liaison peptidique; le second est salifié par l'acide phytique.

La teneur en phosphore phytique du précipité est directement proportionnelle au nombre de groupes basiques de la protéine, désigné conventionnellement par N_b pour une protéine ramenée au poids moléculaire de 100.000 et renfermant 16 pour 100 d'azote total.

Ceci ne se produit qu'avec les protéines de poids moléculaire élevé. C'est ainsi que l'acide phytique ne précipite pas les peptones (Courtois et Barré 24) ni même la gélatine (Hill et Tyler 49). Mais si l'on met au contact de la pepsine un substrat convenablement choisi, l'on pourra, après hydrolyse, précipiter la fraction protéique qui n'a pas été dégradée; les produits de dégradation ne précipiteront pas et resteront dans le filtrat (Barré 5).

Cette constatation est à la base même de notre travail. De multiples possibilités d'analyse s'offrent, en effet, après la précipitation par l'acide phytique de la protéine non hydrolysée.

a) Dosage de la protéine non digérée : cette protéine est associée à l'acide phytique dans le précipité.

b) Dosage dans la fraction soluble, des produits résultant de l'hydrolyse.

c) Emploi de l'acide phytique en quantité connue et en excès, puis détermination de cet excès non précipité avec la protéine.

a) Dosage de la protéine associée à l'acide phytique dans le précipité -

Nous déterminons dans ce précipité, d'une part, la teneur en azote total par la méthode de Kjeldahl, d'autre part, la teneur en phosphore phytique. Ces deux déterminations permettent de calculer le nombre de groupes basiques de la protéine. Enfin, nous dosons colorimétriquement la protéine précipitée, en utilisant la réaction dite du biuret.

b) Dosage dans la fraction soluble des produits résultant de l'hydrolyse -

Nous utilisons la technique du biuret comme dans les précipités.

c) Dosage de l'acide phytique en excès -

On pourrait doser l'acide phytique en excès, en minéralisant le liquide et en pratiquant un dosage d'acide orthophosphorique; ce protocole opératoire est fort long, aussi avons-nous tenté d'utiliser la méthode volumétrique de Heubner et Stadler (48). L'acide phytique forme avec les sels ferriques une combinaison très insoluble en milieu acide. Lorsque l'on verse, goutte à goutte, une solution titrée de chlorure ferrique dans une solution d'acide phytique acidifiée par l'acide chlorhydrique, il apparaît, dès le début, un louche dû au phytate ferrique; dès que tout l'acide phytique est combiné au fer, l'excès de chlorure ferrique fait virer un indicateur des ions Fe^{+++} .

Le précipité de phytate ferrique renferme 4 atomes de fer pour une molécule d'acide phytique (Courtois et coll.26); en présence d'un grand excès de sel ferrique, il se fixe progressivement jusqu'à 8 atomes de fer.

Quand on réalise la précipitation en milieu suffisamment acide, l'acide orthophosphorique n'interfère que lorsque sa concentration est très nettement supérieure à celle de l'acide phytique.

Le thiocyanate d'ammonium est utilisable comme indicateur final. Une certaine pratique de la méthode permet de l'utiliser avec assez de sécurité dans les milieux qui ne sont pas trop complexes. Le milieu réactionnel résultant de l'action de la pepsine sur l'édestine, peut se prêter au dosage volumétrique de l'acide phytique par les sels ferriques.

Nous avons donc retenu ce dosage, par suite de sa simplicité, pour une estimation approximative et rapide de l'activité de la pepsine.

C - CHOIX DU SUBSTRAT -

Nous avons éliminé les substrats insolubles tels que fibrine, caséine qui se prêtent mal à des essais de cinétique. Nous n'avons pas davantage retenu l'hémoglobine qui ne peut être utilisée, si l'on choisit la technique du biuret, pour doser la protéine non transformée par l'enzyme.

D'autre part, la dégradation des molécules protéiques par les enzymes protéolytiques est spécifique selon l'enzyme utilisé; il faut donc choisir, pour l'hydrolyse, un substrat dont la molécule ne soit pas trop complexe afin de limiter le nombre de produits obtenus dans l'hydrolyse. Notre choix s'est fixé sur l'édestine que l'on peut se procurer facilement dans le commerce. Plusieurs auteurs préconisent d'ailleurs l'édestine pour le dosage de la pepsine : Gottlieb (40), Fuld et Levison (37), Plé (38), Cortesi (22).

Pour nos essais, nous avons utilisé le produit de la firme Hoffmann-La Roche qui nous a donné satisfaction.

L'édestine est une globuline de poids moléculaire voisin de 300.000, existant à l'état naturel dans les graines de chènevis, fruits du Cannabis Sativa, Cannabinées, groupe des Urticacées, Dicotylédones Apétales unisexuées.

L'édestine se présente sous la forme d'une poudre blanc-jaunâtre, inodore, de saveur fade. Elle est insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions salines étendues, soluble aussi dans les acides dilués. Elle précipite avec les réactifs généraux des protéines : acide trichloracétique - acide phosphotungstique - acide phosphomolybdique; les réactions du biuret, de Millon et la réaction xanthroprotéique sont positives.

Les graines de chènevis contiennent 13 pour 100 environ de leur poids d'édestine (Goris 39). Celle-ci s'y trouve mélangée à une quantité notable de matières grasses. Un mode opératoire d'extraction figure dans la thèse de Cortési (22). On broie les graines puis on fait une lixiviation à l'aide d'éther de pétrole. L'opération est répétée plusieurs fois, jusqu'à élimination complète des lipides présents dans les graines. La poudre épuisée est ensuite desséchée, pulvérisée et tamisée, afin de la débarrasser des débris grossiers des téguments, puis elle est traitée par une solution aqueuse de chlorure de sodium à 10 pour cent. on laisse en contact plusieurs heures et on filtre; le chlorure de sodium est éliminé par dialyse, et l'édestine précipite.

- DEUXIEME PARTIE - CHAPITRE II -

Essais préliminaires d'orientation

Vérification de la précipitation intégrale de l'édestine par l'acide phytique -

Nous avons utilisé, comme source d'acide phytique, le phytinate de sodium qui nous a été obligeamment fourni par la firme Ciba (1).

Nous avons tout d'abord vérifié que l'édestine précipite totalement, par le phytate de sodium. Nous avons préparé des solutions d'édestine contenant respectivement : 5 mg, 10 mg, 20 mg, et 25 mg par millilitre. L'édestine, n'étant pas naturellement soluble dans l'eau, nous l'avons délayée avec quelques millilitres d'eau au mortier, puis solubilisée, en ajoutant, goutte à goutte, la quantité d'acide chlorhydrique $N/1$ nécessaire pour dissoudre. Les solutions d'édestine sont conservées au voisinage de 0°.

La solution de phytinate de sodium utilisée pour la précipitation de l'édestine est $\frac{M}{20}$ en phosphore. Pour la préparer, on pèse 1,295 g. de phytinate Ciba à 35 OH_2 que l'on dissout dans l'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$ de façon à obtenir un volume final de 100 ml.

(1) Nous présentons nos vifs remerciements à la firme Ciba, qui nous a gracieusement procuré le phytinate nécessaire à nos essais.

Nous avons mis en contact dans des tubes à centrifuger :

solution d'édestine : 1 ml.

solution de phytate : 1 ml.

eau distillée qsp. : 20 ml.

Après une heure de contact, à la température du laboratoire, nous centrifugeons quinze minutes, à vitesse modérée (4.000 tours); le précipité adhère bien au fond du tube et il est facile de séparer le liquide surnageant, par décantation. On retourne alors les tubes sur des feuilles de papier filtre, afin d'éliminer les dernières gouttes de liquide surnageant.

Nous avons vérifié que la précipitation de l'édestine est totale, en ajoutant à 1 ml. de liquide surnageant, 1 ml. d'acide trichloracétique à 20 %; il n'y a pas formation de louche. Nous avons ensuite procédé à des dosages de phosphore dans les liquides surnageants, les précipités et la solution de phytate. Pour ces dosages, nous avons utilisé la technique de Misson (62), selon le protocole opératoire de Fleury et Leclerc (34). Le phosphore est engagé dans un complexe phosphomolybdovanadique, coloré en jaune et dont la formule serait : $\text{PO}_4 (\text{NH}_4)_3, \text{VO}_3 (\text{NH}_4)_{16} \text{Mo O}_3$ (Misson 62). La coloration jaune est évaluée à l'électrophotomètre. La courbe étalon est une droite pour les solutions contenant de 5 à 30 μg de phosphore par millilitre.

1) Cas du précipité -

Le précipité est délayé dans 5 ml. de réactif nitrozincique :

Nitrate de zinc $(\text{NO}_3)_2 \text{ Zn } 6 \text{ H}_2 \text{ O}$: 10 g.

Acide nitrique pur : 25 ml.

et minéralisé sous la hotte. On dissout ensuite le produit de la minéralisation dans 3 à 4 ml. d'acide chlorhydrique 5 N en chauffant si nécessaire. On transvase dans une fiole de 50 ml. On rince plusieurs fois, à l'eau, le tube dans lequel on a fait la minéralisation et on verse les eaux de lavage dans la fiole. On complète à 50 ml. avec de l'eau.

2) Cas du liquide surnageant -

A un millilitre de liquide surnageant, on ajoute 6 gouttes de réactif nitrozincique :

Nitrate de zinc $(\text{NO}_3)_2 \text{ Zn } 6 \text{ H}_2 \text{ O}$: 16 g.

Acide nitrique pur : 25 ml.

Après minéralisation, on reprend par 1 ml. d'acide chlorhydrique N puis on dilue à 10 ml. avec de l'eau distillée. On opère de la même façon pour la solution titrée de phytate.

On prépare ensuite une courbe étalon avec des solutions à concentrations croissantes de phosphate monopotassique pur, contenant respectivement 5, 10, 15, 20, 25 μg de phosphore par millilitre. Ces dilutions sont préparées extemporanément à partir d'une solution-mère dont la

composition est la suivante :

phosphate monopotassique : 0 g. 2195
acide nitrique pur : 3,5 ml.
eau qsp. : 100 ml.
1 ml. = 500 µg de phosphore

Ce réactif, maintenu à la glacière se conserve bien. L'acide nitrique contribue d'ailleurs à assurer la conservation.

On prélève 2 ml. de chaque dilution et on ajoute 2 ml. de réactif de Misson. Ce dernier est préparé de la façon suivante :

- Solution I : Molybdate d'ammonium : 100 g.
Solution officinale d'ammoniaque : 10 ml.
Eau distillée qsp. : 1000 ml.

L'addition d'ammoniaque a pour but d'assurer la conservation de la solution pendant plusieurs mois.

- Solution II : Vanadate d'ammonium : 2 g. 35
Eau distillée : 500 ml.

On dissout à chaud le vanadate dans l'eau distillée et, après refroidissement, on verse, lentement et en agitant, le mélange suivant :

Acide nitrique : D = 1,33 (36° B) : 10 ml.
Eau distillée : 10 ml.

Il se forme, au début de l'addition de l'acide nitrique, un léger précipité rouge que l'on dissout par agitation. On complète ensuite à 1.000 ml. avec de l'eau distillée.

- Solution III : Réactif nitro-vanadomolybdique

Dans un ballon jaugé de 500 ml. on mesure successivement :

Acide nitrique D = 1,38	: 67 ml.
Solution I	: 100 ml.
Solution II	: 100 ml.
Eau qsp.	: 500 ml.

On opère de même, pour chaque solution à étudier et on détermine, après cinq minutes, l'intensité de la coloration obtenue au photolorimètre de Bonet-Maury; longueur d'onde employée : 470 $\text{\AA}$.

Après une heure de contact des différentes solutions d'édestine avec le phytate de sodium, nous avons obtenu les résultats suivants groupés dans le tableau II.

T A B L E A U I I

Teneur en phosphore du précipité acide phytique-édestine
en fonction de la concentration en
édestine

Edestine mise en oeuvre	Phosphore dans le liquide sur-nageant	Phosphore dans le précipité acide phytique-édestine	Total
5 mg.	1.400 μ g	210 μ g soit 42 μ g par mg. édestine	1.610 μ g
10 mg.	1.160 μ g	400 μ g soit 40 μ g par mg. édestine	1.560 μ g
20 mg.	860 μ g	780 μ g soit 39 μ g par mg. édestine	1.640 μ g
25 mg.	620 μ g	980 μ g soit 39 μ g par mg. édestine	1.600 μ g

En dosant le phosphore par cette même méthode dans la solution de phytate de sodium nous avons trouvé 1615 μ g de phosphore par millilitre de solution. Les résultats du tableau II indiquent que la quantité de phosphore phytique dans le précipité est directement proportionnelle à la quantité d'édestine mise en oeuvre.

Nous n'avons pas trouvé de différences sensibles, en laissant les solutions d'édestine en contact avec la solution de phytate pendant 12 heures, au lieu d'une heure comme précédemment. C'est ce que montre le tableau III.

T A B L E A U III		
Influence de la durée de contact sur la teneur en phosphore du précipité acide phytique-édestine		
Edestine mise en oeuvre	Après 1 heure de contact	Après 12 heures de contact
5 mg.	1.400 μg ⁽¹⁾	1.348 μg
10 mg.	1.160 μg	1.175 μg
20 mg.	860 μg	830 μg
25 mg.	620 μg	637 μg

(1) Les chiffres du tableau correspondent à la teneur en phosphore phytique du liquide surnageant.

Détermination de la teneur en azote des précipités acide phytique-protéine -

Nous avons dosé l'azote dans les précipités acide phytique-édestine par la méthode de Kjeldahl. Nous opérons de la façon suivante :

Le précipité est délayé avec 2 ml. d'acide sulfurique concentré ($D = 1,83$) et transvasé soigneusement

dans une fiole de Kjeldahl de 50 ml. environ. On rince plusieurs fois à l'eau distillée et on ajoute les eaux de rinçage au contenu de la fiole.

Nous avons utilisé comme catalyseur 0 gr. 20 d'un mélange à parties égales de sulfate cuivrique et de sulfate dipotassique. Nous ajoutons pour faire la minéralisation quelques billes de verre. Après minéralisation, nous laissons refroidir, puis nous transvasons le contenu du matras dans l'ampoule d'un appareil à distillation qui est une variante de l'appareil de Pregl (60). Nous ajoutons 8 ml. de lessive de soude pure concentrée et nous faisons arriver dans l'appareil un courant de vapeur d'eau. L'ammoniac se dégage et est reçu dans un bécher contenant de l'eau distillée et quelques gouttes d'une solution alcoolique de rouge de méthyle et de bleu de méthylène. Nous titrons l'ammoniac, au fur et à mesure de la distillation par l'acide sulfurique N/50.

Nous suivons le même procédé opératoire pour les liquides surnageants.

Nous n'avons jamais retrouvé d'azote dans ces derniers, ce qui est confirmé par le dosage de l'azote total du précipité (tableau IV). L'édestine introduite se retrouve totalement dans le précipité acide phytiqueprotéine.

T A B L E A U I V

Teneur en édestine du précipité acide phytique-édestine
calculée d'après le taux d'azote du précipité

Edestine mise en oeuvre	Edestine calculée d'après le taux d'azote des précipités
5 mg	5 mg 05
5 mg	5 mg 14
20 mg	19 mg 12
20 mg	21 mg
25 mg	24 mg 5
25 mg	22 mg 3
25 mg	22 mg 75

Nous avons utilisé dans les calculs le coefficient 6,25 habituellement admis pour déterminer le poids d'une protéine à partir de son poids d'azote total. La valeur 6,25 correspond à 16 pour 100 d'azote dans la protéine.

Dans la suite de notre travail, nous avons, à plusieurs reprises, contrôlé les précipités acide phytique-édestine témoins, en procédant au dosage de l'azote. Nous donnons ci-après les valeurs obtenues pour des précipités à partir de 50 mg. d'édestine :

Théorie :	Edestine calculée d'après le taux d'azote multiplié par 6,25
50 mg	51 mg. 25
50 mg	49 mg 70
50 mg	48 mg 3
50 mg	49 mg 70
50 mg	47 mg 25
50 mg	51 mg 9
50 mg	51 mg 6
50 mg	50 mg 4
50 mg	48 mg 8
50 mg	48 mg 35
50 mg	50 mg 3
50 mg	51 mg 4

En additionnant les résultats, nous obtenons le total de 598,95 pour 12 dosages. La moyenne générale se trouve être de 49,91 mg.

En résumé, l'édestine se combine à l'acide phytique en donnant une combinaison insoluble en milieu suffisamment acide.

Nous avons pu établir 1°) par des dosages de phosphore dans le précipité protéine-acide phytique,
2°) par des dosages d'azote total dans ce même précipité, que la précipitation de l'édestine par l'acide phytique est totale.

- DEUXIEME PARTIE - CHAPITRE III -

Protocole opératoire des essais systématiques

Ayant pu établir que l'acide phytique insolubilisait totalement l'édestine; nous avons étudié la protéolyse par des pepsines d'origine différente. Nous allons décrire en détail le protocole opératoire de ces essais, puis nous exposerons et commenterons nos résultats, dans le chapitre suivant.

A) REACTIFS EMPLOYES -

a) Substrat - Nous utilisons une solution d'édestine à 20 mg. par ml. La préparation de cette solution est indiquée page 47.

b) Solution tampon - 50 ml. d'une solution aqueuse de chlorure de potassium $\frac{M}{5}$ et 30 ml. d'acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$ sont complétés à 200 ml. par addition d'eau distillée.

c) Enzyme - L'enzyme est préalablement desséché sous vide dans un exsiccateur à la température du laboratoire jusqu'à poids constant. Au moment de l'essai, la pepsine est dissoute par agitation dans la solution tampon; pour des essais en série, nous préparons une solution-mère de pepsine diluée par la suite, avec différentes doses du tampon.

B - CONDITIONS DE L'HYDROLYSE -

Dans trois tubes à centrifuger à fond conique, de 45 ml. de capacité, numérotés I, II, III, nous mesurons dans l'ordre :

	Tube I	Tube II	Tube III
Solution d'édestine à 2 %	2,5 ml	0 ml	2,5 ml
Solution tampon	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Eau distillée	10 ml	12,5 ml	10 ml

Les tubes sont placés pendant 30 minutes dans un bain-marie à 37°; nous ajoutons alors 1 ml. de solution de pepsine dans les tubes I et II et nous maintenons les trois tubes, pendant un temps déterminé, dans le-bain marie à 37°.

Il est presque impossible de tamponner d'une façon satisfaisante un milieu aussi acide; l'association de la solution d'édestine, du tampon et de la solution de pepsine forme un mélange dont le pH varie de 2,17 à 2,22.

(Pour mesurer les pH, nous avons utilisé l'appareil Radiometer -pH meter 3-)⁽¹⁾.

Ce pH s'élève au cours de la protéolyse et, selon l'intensité de cette dernière, va atteindre des

(1) Maison Jarre et Jacquin

valeurs s'étageant de 2,23 à 2,27. Nous n'avons pas employé un tampon plus concentré car sa force ionique modifierait l'activité de l'enzyme; de plus, la précipitation des protéines par l'acide phytique est incomplète lorsque le milieu renferme une forte proportion de sels comme l'ont montré Barré, Courtois et Wormser (11).

Après une durée d'hydrolyse variable, les tubes sont refroidis le plus rapidement possible dans de l'eau glacée; nous ajoutons dans chaque tube 2,5 ml. d'acide phytique $\frac{M}{20}$ en phosphore (la composition de cette solution est donnée page 47) et nous complétons à 20 ml. avec de l'eau distillée. Le précipité qui apparaît immédiatement, se sédimente par séjour de trente minutes à la glacière. Les tubes doivent y être maintenus dans un bain d'eau glacée, la pepsine conservant une partie de son activité en présence d'acide phytique (Barré 5). Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 6.000 tours; le liquide surnageant est recueilli, les tubes retournés sur des feuilles de papier filtre sont mis à égoutter, afin de débarrasser les précipités des traces de liquide.

C - DETERMINATIONS SUR LE PRECIPITE -

Nous avons évalué l'activité protéolytique de la pepsine selon trois techniques différentes, à partir du précipité. Dans tous les cas, la détermination est faite sur la totalité du précipité collecté dans un tube. Les techniques employées sont les suivantes :

1°) Détermination de l'azote total par la technique de Kjeldahl que nous avons décrite page 53. Nous avons employé le coefficient 6,25 habituellement utilisé, pour déterminer la quantité de protéine non hydrolysée à partir de l'azote. Nous avons indiqué, tableau IV, que cette méthode permettait de doser la protéine.

2°) Détermination du phosphore dans le précipité phytique, par la méthode nitrovanadomolybdique de Misson après minéralisation zincique du précipité, comme nous l'avons indiqué dans les essais préliminaires pages 49-50.

3°) Détermination de l'édestine non hydrolysée par la réaction dite du biuret. Le précipité est dissous dans 8 ml. de soude à 1 %, utilisée en plusieurs fois, en transvasant dans un flacon jaugé de 10 ml. puis en complétant à ce volume. Lorsque la dissolution du précipité s'avère difficile, elle peut être facilitée en plongeant le tube pendant quelques minutes, dans un bain-marie d'eau tiède. Il est cependant préférable d'éviter tout risque d'hydrolyse alcaline des liaisons peptidiques.

Nous ajoutons ensuite, à un ml. de la solution sodique de protéine 4 ml. du réactif cupro-tartrique de Gornall, préparé selon la formule indiquée par P. Fleury (33).

- Sulfate de cuivre à 5 OH₂ 1,5 g.
- Tartrate double de sodium
et de potassium . 6 g.
- Soude décarbonatée30 g.
- Iodure de potassium 1 g.
- Eau distillée qsp1000 ml.

Le réactif est conservé à l'obscurité, dans un flacon paraffiné intérieurement et sous toluène.

La soude décarbonatée est ainsi obtenue :

- Soude pure en bâtons 200 g.
- Eau distillée 200 ml.

Le carbonate de sodium peu soluble dans la soude concentrée se dépose en quelques jours. On titre et on prélève un volume correspondant à 30 g.

Nous laissons la coloration bleue se développer pendant 20 minutes, à la température du laboratoire, et nous en apprécions l'intensité au photocolorimètre de Bonet-Maury à la longueur d'onde de 530 Å., écran vert. De la valeur obtenue, nous retranchons l'absorption initiale d'un témoin constitué par un mélange de 4 ml. de réactif cupro-tartrique et de 1 ml. de soude à 1 %. Le pourcentage d'hydrolyse est calculé par rapport à l'édestine non soumise à la protéolyse du tube III.

Lorsque l'on procède à une série de dosages, l'essai du tube III n'est effectué qu'une seule fois, à titre de contrôle, et on évalue l'intensité de la coloration des précipités des tubes de la série I par rapport à une courbe d'étalonnage. La courbe est établie avec des dilutions de la solution-mère d'édestine à 2 %; ces dilutions contiennent de 0,5 à 5 mg. d'édestine par millilitre. A 1 ml. de chaque dilution, on ajoute 4 ml. de réactif de Gornall. L'absorption lumineuse est directement proportionnelle à la concentration d'édestine; nous reproduisons page 63 figure 1, une de nos courbes d'étalonnage; nous n'avons pas relevé de grands écarts entre diverses courbes d'étalonnage établies à intervalles périodiques. C'est ce qu'indique le tableau V, page 64.

Lorsque la protéolyse est accentuée, le précipité phytique est peu abondant; il n'est alors redissous que dans 5 ml. de soude à 1 %.

L'intensité de la réaction du biuret est ainsi évaluée en mg. d'édestine non transformée, cette valeur est retranchée des 50 mg. de substrat initial; l'on obtient ainsi la quantité d'édestine transformée et on calcule le pourcentage d'hydrolyse.

L'essai témoin II a pour but de permettre de déduire la proportion de protéine apportée par la pepsine étudiée; pour toutes les préparations purifiées dont nous

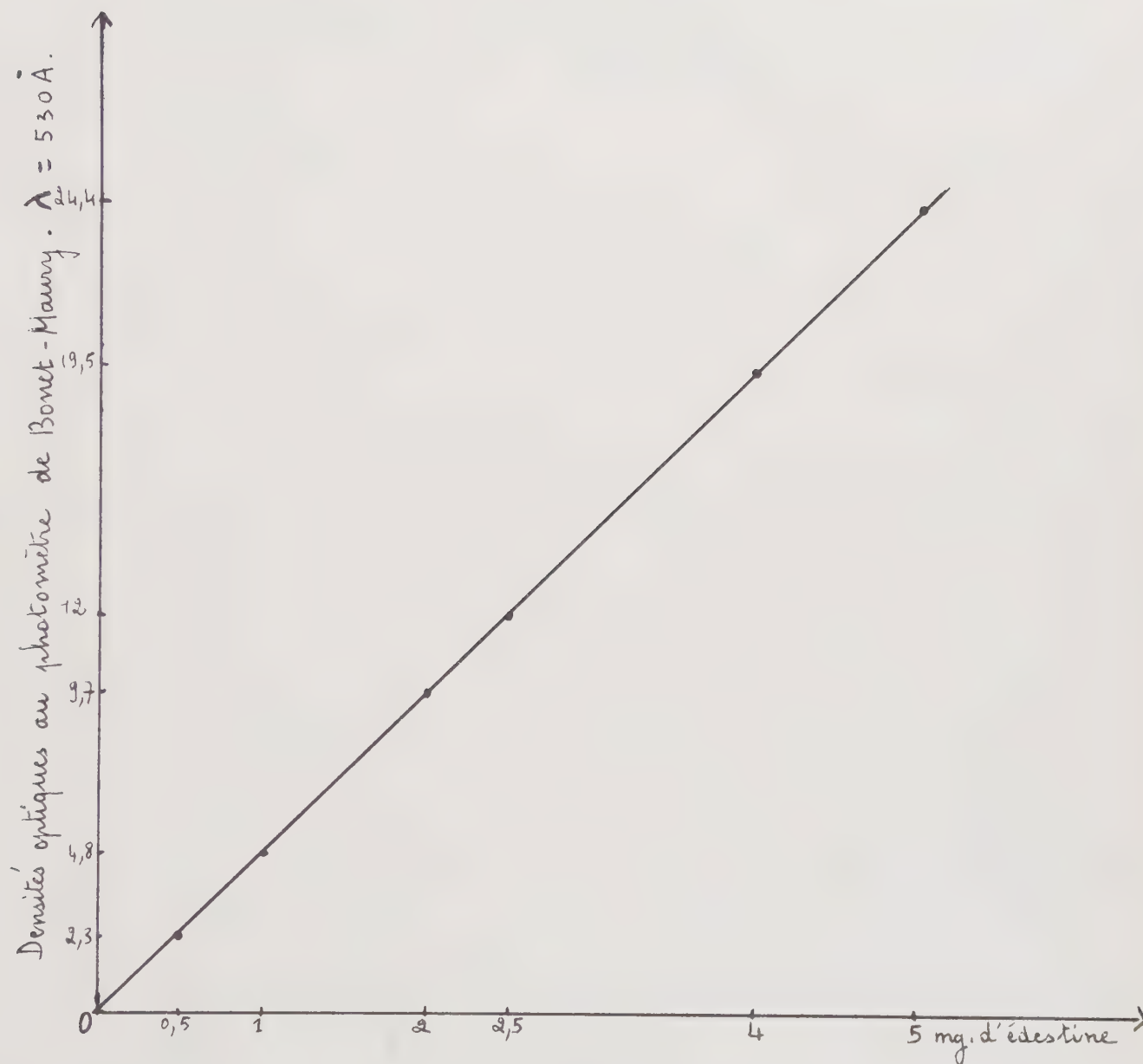


Figure I.

Courbe d'étalonnage de l'édestine.

TABLEAU V

Densités optiques des gammes d'édestine au photocolorimètre
Bonet-Maury

Quantités :
d'édestine:

0 mg	8,5 ⁽¹⁾	8,8	8,4	8,5	8,6
0 mg 5	10,8	11,2	10,8	10,9	10,9
1 mg	13,2	13,4	13,4	13,4	13,6
2 mg	17,9	18,4	18,4	18,5	18,5
2 mg 5	20,4	20,8	20,5	20,9	20,4
4 mg	28,2	28	28,1	28,4	27,8
5 mg	32,8	32,4	32,6	33,4	33,8

(1) Les chiffres du tableau correspondent à des ^{1/100} unités de densité optique.

opposons moins de 0,25 mg. à 50 mg. d'édestine, la correction est négligeable. Dans la pratique courante d'une série de dosages, il est possible, après un essai de confirmation, de ne plus constituer le tube témoin II.

Le précipité acide phytique-protéine ne peut être lavé, il se dissocie partiellement dans l'eau distillée. D'autre part, un net excès d'acide phytique est nécessaire pour insolubiliser totalement la protéine. Une certaine proportion de phase aqueuse riche en acide phytique imbibe le précipité ou demeure sur les parois du tube; on peut considérer que ces quantités sont à peu près égales pour les tubes II et III. La différence des essais III et I ($\text{III} - \text{I}$) correspondra à la fraction de la protéine digérée.

L'essai III, indispensable si l'on dose le phosphore, ne l'est plus, lorsque l'on détermine l'azote total ou procède à la réaction du biuret, car l'erreur provoquée par le liquide imbibant le précipité est alors des plus minimes.

D - DETERMINATIONS SUR LE LIQUIDE SURNAGEANT -

En plus des trois techniques utilisées comme dans le cas du précipité (déterminations de l'azote total, du phosphore phytique et des substances biurétogènes) nous en avons utilisé deux autres pour doser la protéolyse d'après

le liquide surnageant. Ces techniques sont :

1°) le dosage de la tyrosine

2°) le dosage de l'acide phytique en excès.

Nous décrirons en détail ces deux techniques, puis nous exposerons nos résultats.

1°) Dosage de la tyrosine -

La tyrosine a été évaluée par colorimétrie, en utilisant son action réductrice sur le réactif des phénols de Folin et Ciocalteu (36). Ce réactif est préparé de la façon suivante :

Dans un ballon jaugé d'un litre, on introduit :

Tungstate de sodium : $\text{WO}_4 \text{Na}_2, 2 \text{H}_2 \text{O}$ 100 g.

Molybdate de sodium : $\text{MoO}_4 \text{Na}_2, 2 \text{H}_2 \text{O}$ 25 g.

Eau distillée : 700 ml.

On dissout par agitation, puis on ajoute :

Acide phosphorique à 85 % : 50 ml.

Acide chlorhydrique concentré : 100 ml.

On porte à ébullition à reflux pendant 10 heures.

Après refroidissement on ajoute :

Sulfate de lithium : 150 g.

Eau distillée : 50 ml.

puis quelques gouttes de brome pour décolorer. On porte à nouveau à l'ébullition pour éliminer l'excès de brome, puis on refroidit, on complète à 1000 ml. avec de l'eau distillée et l'on filtre. Le réactif ne doit pas présenter de coloration verdâtre. Notre réactif présentait en réalité une légère coloration verte. Au moment de l'emploi nous diluons le réactif au $\frac{1}{3}$ avec de l'eau distillée.

Nous avons suivi le mode opératoire décrit ci-dessous :

A 1 ml. de liquide surnageant, nous ajoutons 2 ml. de soude $\frac{N}{5}$ et 0 ml. 6 de réactif de Folin, dilué au $\frac{1}{3}$. Il se développe une coloration bleue dont nous apprécions l'intensité au photolorimètre de Bonet-Maury, à la longueur d'onde de 620 $\text{\AA}$, écran rouge. Nous comparons les colorations obtenues avec les échantillons à doser et celles fournies par des solutions titrées de tyrosine. Ces dernières sont préparées de la façon suivante : une solution mère de tyrosine dans l'acide chlorhydrique 0,2 N, renfermant 100 μg de tyrosine par ml, est diluée extemporanément, de manière à obtenir des solutions contenant respectivement 5, 10, 20, 30, 40, 50 μg de tyrosine par ml.

Nous avons obtenu les résultats suivants, rassemblés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

µg de tyrosine libérés dans l'hydrolyse de l'édestine par différentes pepsines					
Durée d'hydrolyse en minutes	Pepsine de la Pharmacie Centrale: des Hôpitaux			Pepsine Byla	
	0 mg 1	0 mg 25	0 mg 5	0 mg 5	
10	358	389			
20	460	540	625		984
40	558	650	742		1263
80	660	865	910		1451
160	826	1015	1054		1696

Les courbes étalon, établies à intervalles périodiques, nous ont donné d'assez grands écarts au photocolorimètre, surtout lorsque l'on dépasse 50 µg de tyrosine par millilitre.

C'est ce qu'indiquent les chiffres du tableau VII,
page 69.

TABLEAU VII

Colorations des courbes étalon de tyrosine avec le réactif
de Folin et Ciocalteu

Quantité de tyrosine en μ g	Densités optiques au photocolorimètre de Bonet - Maury			
5	4,7	4,4	4,6	5,9
10	9,5	9,3	10,4	11,4
20	19,4	19,8	16,6	19,3
25			21,1	22,3
30		25,0		
40	34,0	32,1		
50	38,5	37,7	38,9	40,1
60	48,5	42,4		
80	57,7	52,3		
100	69,7	63,9		

Les différences de coloration observées entre
deux tubes consécutifs de la gamme deviennent beaucoup moins
significatives si l'on considère les nets écarts observés
pour un même tube dans les diverses courbes.

Ainsi, dans le tableau VII, nous avons d'après la première colonne, une différence de 10 unités de densité optique entre le tube 10 μ g et le tube 20 μ g. Cette différence est de 6 unités dans la troisième colonne et de 8 dans la quatrième, mais pour le même tube de 10 μ g, nous trouvons des différences pouvant atteindre 2 unités de densité optique (1ère et 4ème colonnes).

Nous avons pensé que cette instabilité de coloration provenait du réactif de Folin. Plusieurs auteurs ont, dans leurs travaux, suivi la technique de Folin mais en modifiant la composition d'un réactif. Heidelberger et Mac Pherson (43) substituent à la soude une solution de carbonate de soude à 12,5 pour 100. Ils recommandent de laisser la coloration se développer trente minutes. Fleury (33) utilise le réactif de Folin non dilué mais en très petite quantité (2 gouttes). (Dans la technique originale, le réactif est dilué au 1/3 extemporanément). De plus, il attend une heure avant d'évaluer la coloration.

Herriott (44) et Kunitz (56) font la coloration en présence de sulfate de cuivre et de soude. Christensen (21) utilise la méthode d'Herriott mais en substituant du carbonate de soude à la soude.

Nous avons pratiqué ces différentes modifications, sans obtenir plus de régularité dans l'ensemble des déterminations.

En règle générale, nous n'avons donc pas retenu ce dosage qui s'avère moins précis que les autres. Il nous a simplement permis de vérifier la libération de la tyrosine au cours de l'hydrolyse pepsique. De l'examen du tableau VI nous voyons que cette libération se fait surtout au début de la protéolyse et qu'elle n'augmente pas beaucoup lorsque l'on prolonge la durée d'hydrolyse. Ceci est en accord avec la règle du "tout ou rien" citée pour la première fois par Tiselius et Erikson-Quensel en 1939. Ces auteurs montrent que dans l'hydrolyse de l'ovalbumine par la pepsine, le substrat est, dès le début, scindé en fractions de poids moléculaire peu élevé qui seraient des octopeptides.

Laine (57) hydrolysant la zéine par la pepsine, pendant plusieurs jours, a observé que la quantité de tyrosine libérée au début de la protéolyse ne se modifiait plus ensuite jusqu'à la fin de l'expérience. (Tableau VIII, page 72). Cette règle s'applique d'ailleurs à d'autres enzymes que la pepsine : la trypsine hydrolysant la globuline et la sérum-albumine libère au début de la protéolyse, des polypeptides dont la constitution ne se modifie plus jusqu'à la fin de l'hydrolyse.

T A B L E A U V I I I

Libération de tyrosine au cours de la protéolyse pepsique de la zéine,
d'après Laine (57).

Durée d'hydrolyse	2 heures	1 jour	2 jours	4 jours	8 jours	17 jours
Pourcentage de la protéine initiale						
précipitable par l'acide trichloracé- tique	90,3	50,7	27,3	18,3	11,6	8,7
Pourcentage N tyrosine dans la fraction préci- pitable par l'acide trichloracétique	2,69	2,64	2,60	2,66	2,67	2,60

2°) - Dosage de l'acide phytique en excès, par les sels ferriques -

Le titrage de l'acide phytique par les sels ferriques a été couramment utilisé depuis 1914, date à laquelle Heubner et Stadler (48) ont décrit leur méthode originale. Nous en avons décrit le principe pages 43-44. Depuis, la méthode a subi de nombreuses adaptations : Knowles et coll. (54) substituent le salicylate de soude au sulfocyanate employé à l'origine. Andrews (2) procède à une filtration à la fin du dosage. Javillier et Colin (53), Toffoli et Marelli (75) utilisent un excès de chlorure ferrique, puis déterminent le taux de phosphore dans le précipité.

Nous avons utilisé le protocole opératoire suivant :

- Réactifs

1° Solution de sel ferrique.

A 10 ml. de perchlorure de fer officinal, on ajoute 90 ml. d'acide chlorhydrique $\frac{N}{100}$; on titre la solution ainsi obtenue, par iodométrie de la façon suivante.

Dans un Erlenmeyer on introduit :

Solution de chlorure ferrique 1 ml.

Iodure de potassium à 50 % 3 ml.

On agite et on attend quelques minutes; il y a libération d'iode de l'iodure; on titre l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium N/10.

La solution ferrique ainsi titrée est amenée, par dilution avec de l'acide chlorhydrique $\frac{N}{100}$ à une concentration $\frac{M}{100}$ en fer trivalent.

2° Solution aqueuse de thiocyanate d'ammonium à 0 g. 3 pour 100 ml.

- Dosage - On prélève 10 ml. de liquide surnageant le précipité, dans un Erlenmeyer; on y ajoute 20 ml. d'acide chlorhydrique officinal, puis 10 ml. de la solution de sulfo-cyanate d'ammonium.

A l'aide d'une burette, la solution ferrique est ajoutée goutte à goutte en agitant continuellement; le virage se manifeste par une teinte rose saumon persistant 20 secondes.

Le dosage est effectué sur les tubes I, II et III.

La solution d'acide phytique est traitée de façon similaire :

2,5 ml. d'acide phytique $\frac{M}{20}$ en phosphore sont additionnés de 2,5 ml. de la solution tampon Cl K - Cl H et de 15 ml. d'eau distillée, nous prélevons 10 ml. du mélange et nous titrons comme les liquides surnageants, par la solution ferrique.

- Calculs - Soit a ml de solution ferrique utilisée pour le liquide surnageant du tube I, b ml pour le tube II, c ml pour le tube III et d ml pour la solution d'acide phytique.

(d - c) correspond à l'acide phytique précipité par la quantité d'édestine soumise à l'action de la pepsine.

(d - b) correspond à l'acide phytique combiné aux protéines de la préparation de pepsine.

(d - a) représente la somme de l'acide phytique précipité par l'édestine non protéolysée et de celui précipité par les protéines de la préparation de pepsine.

Le rapport :

$$\frac{(d - c) - (d - a) + (d - b)}{(d - c)} \times 100, \quad \text{soit} \quad \frac{(a - c) + (d - b)}{(d - c)} \times 100$$

indiquera le pourcentage d'hydrolyse de l'édestine.

Lorsque nous opposons moins de 0,25 mg de pepsine à 50 mg d'édestine, l'essai II est inutile car la sensibilité de la méthode volumétrique ne permet pas d'apprécier (d - b); dès lors, le rapport $\frac{(a - c)}{d - c} \times 100$ représentera dans la plupart des cas le pourcentage d'hydrolyse.

- DEUXIEME PARTIE - CHAPITRE IV -

Comparaison de l'évolution de la réaction suivant
les différentes techniques

Nous avons procédé à des séries d'expériences avec différentes pepsines, afin de comparer les résultats obtenus en calculant le pourcentage d'hydrolyse d'après le dosage au perchlorure de fer d'une part, d'après le dosage du phosphore dans le précipité ou le liquide surnageant, d'autre part. La quantité de pepsine mise en oeuvre est différente suivant les échantillons. Dans tous les cas, les pepsines utilisées ont été desséchées à l'exsiccateur en présence de chlorure de calcium.⁽¹⁾

Nous avons résumé les résultats obtenus dans les tableaux suivants (Tableaux IX à XII).

(1) Nous exprimons nos remerciements aux Laboratoires Byla, Organotechnie et O. Bailly, qui nous ont procuré gracieusement les échantillons de pepsines nécessaires à nos essais.

TABEAU IX

Hydrolyse de l'édéstine par la pepsine de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux
de Paris

(Nous opposons 0 mg 5 de pepsine à 20 mg d'édéstine).

Temps d'hydrolyse	Expérience n° 1			Expérience n° 2			Expérience n° 3		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
20'	38,4		28	37	40,5	27,7	34,5	42,4	25
40'	47,4	37,3	41	37,6	38,2	36,7	50,9	51,3	44,7
80'	56,3	42,6	42,2	57,4	53,8	47	71,1	68,3	53,7
160'	81,8	58,4	58,3	97,8	91,3	85,6	91,5	75	89,6

- a) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le précipité.
- b) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le liquide surnageant.
- c) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le dosage de l'acide phytique présent dans le liquide surnageant, déterminé par la technique volumétrique aux sels ferriques.

TABLEAU X

Hydrolyse de l'édestine par la pepsine des Laboratoires Byla

(Nous opposons 0,5 mg de pepsine à 20 mg d'édestine)

Temps d'hydrolyse	Expérience n° 4			Expérience n° 5			Expérience n° 6		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
20'	31,6	16,4	26,8	33,3	21,3	26			
40'	45,4	26,4	43	47,1	31,6	40,5	40,3	37,4	28,4
80'	66,7	45,2	63	61,4	61,3	56,1	64,5	64	47
160'	72,5	66,7	82	100	83,3	79,9	96,4	96,7	81,5

- a) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le précipité.
b) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le liquide surnageant.
c) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le dosage de l'acide phytique présent dans le liquide surnageant, déterminé par la technique volumétrique aux sels ferriques.

TABEAU XI

Hydrolyse par trois pepsines des Laboratoires Organotechnie.

Pepsine A : pepsine lactosée commerciale (titre vers 120-130) C^{le} 9.494

Pepsine B : pepsine américaine (titre vers 650-750 Codex 1949) Electrodialyse C^{le} 4653

Pepsine C : pepsine pure (titre vers 180-200 contient mucine) "haut titre" série 299 C^{le} 9429

Pour les pepsines A et C nous opposons 0,5 mg à 20 mg d'éddestine

Pour la pepsine B, nous opposons 0,1 mg à la même quantité de substrat

Temps d'hydrolyse	Pepsine A		Pepsine B		Pepsine C	
	a	c	a	c	a	c
20'	13,2	17	24,6	22,1	33,3	36,1
40'	38,4	32,6	37,1	37,4	57	54,4
80'	62,1	66,7	59,6	55,7	78,7	72,8
160'	91,4	85	95,4	88	96,7	95,6

a) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le précipité.

c) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le dosage de l'acide phytique présent dans le liquide surnageant, déterminé d'après la technique volumétrique aux sels ferriques.

TABLEAU XII

Hydrolyse par la Pepsine des Laboratoires O. BAILLY

Nous opposons respectivement 0,1 mg - 0,25 mg - 0,5 mg de pepsine à 20 mg d'édénine.

Temps d'hydrolyse:	0,1 mg			0,25 mg			0,5 mg		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
20'	26,6	33,5	32,7	70,6	68,4	56,1	78,6	66	77
40'	52,6	48,7	47,6				93,4	90,1	88,6
80'	84,9	71,2	65,3	87,4	87,1	78,2	95,5	90,7	95,2
160'	92,4	80	79,1	100	100	84,1	100	90	90

- a) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le précipité.
b) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le liquide surnageant.
c) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le dosage de l'acide phytique présent dans le liquide surnageant, déterminé par la technique volumétrique aux sels ferriques.

Nous pouvons, dès à présent, tirer de ces quelques tableaux, les remarques suivantes :

1°) la technique consistant à doser l'excès d'acide phytique par le perchlorure de fer, semble moins précise que les autres; elle conduit cependant de façon régulière, à des pourcentages d'hydrolyse inférieurs à ceux établis par les autres modes de dosage; le dosage par les sels ferriques apparaît donc capable de fournir un moyen rapide d'évaluer la protéolyse.

2°) avec les différents échantillons de pepsines, l'hydrolyse a progressé régulièrement.

3°) dans leur ensemble, les diverses techniques analytiques conduisent à des résultats du même ordre de grandeur.

Ces premiers résultats seront commentés plus en détail, page 97.

- DEUXIEME PARTIE - CHAPITRE V -

Etude de l'hydrolyse par la pepsine en fonction du temps

Nous avons procédé à cet ensemble de déterminations analytiques (dosage du phosphore, de l'azote et des protéines biurétogènes dans le précipité et dans le centrifugat, dosage de l'acide phytique dans le liquide surnageant) sur des produits réactionnels après différentes durées de contact.

Les essais ont été réalisés avec la pepsine B des Laboratoires Organotechnie.

Nous avons utilisé 50 mg d'édestine (soit 2 ml 5 de la solution à 2 %) et 250 µg de pepsine B dissoute dans le tampon. Nous suivons le mode opératoire indiqué page 48.

Trois des essais forment la matière du tableau XIII. Les chiffres du tableau indiquent les pourcentages d'hydrolyse évalués par rapport à l'édestine initiale.

Nous avons d'autre part, reproduit dans la figure 2, les courbes d'hydrolyse d'une expérience.

TABLEAU XIII

Hydrolyse de l'édéstine par la pepsine B Organotechnie en fonction du temps

Durée d'hydrolyse en minutes	Expérience n° 1			Expérience n° 2			Expérience n° 3					
	20	40	80	160	20	40	80	160	20	40	80	160
Dosage de l'azote du précipité	41,8	55,8	76,1	96,6	37,7	44,2	68,8	92,5	37,8	52,2		87,4
Dosage du phosphore du précipité	31,5	48,3	71,8	97,6	40,8		75,8	94,8	36,8	46,1	71,7	83,2
Dosage du phosphore du liquide surnageant	42,5	54,7	79,8	88		61	74,9	93,8	38,1		68,3	96
Biuret du liquide surnageant	36,6	52	70	88	34,2	42,8	69	90,8	34	58,7	75,8	96,2
Acide phytique titré par Cl ₃ Fe dans le liquide surnageant	33,3	48,7	75,6	100	30	44,5	59,5	80	27,2	42,8	60	81,5

Pepsine B Organotechnie : Pepsine américaine (titre vers 650-750 Codex 1949)

Nous opposons 250 μg de pepsine 50 mg. d'édéstine.

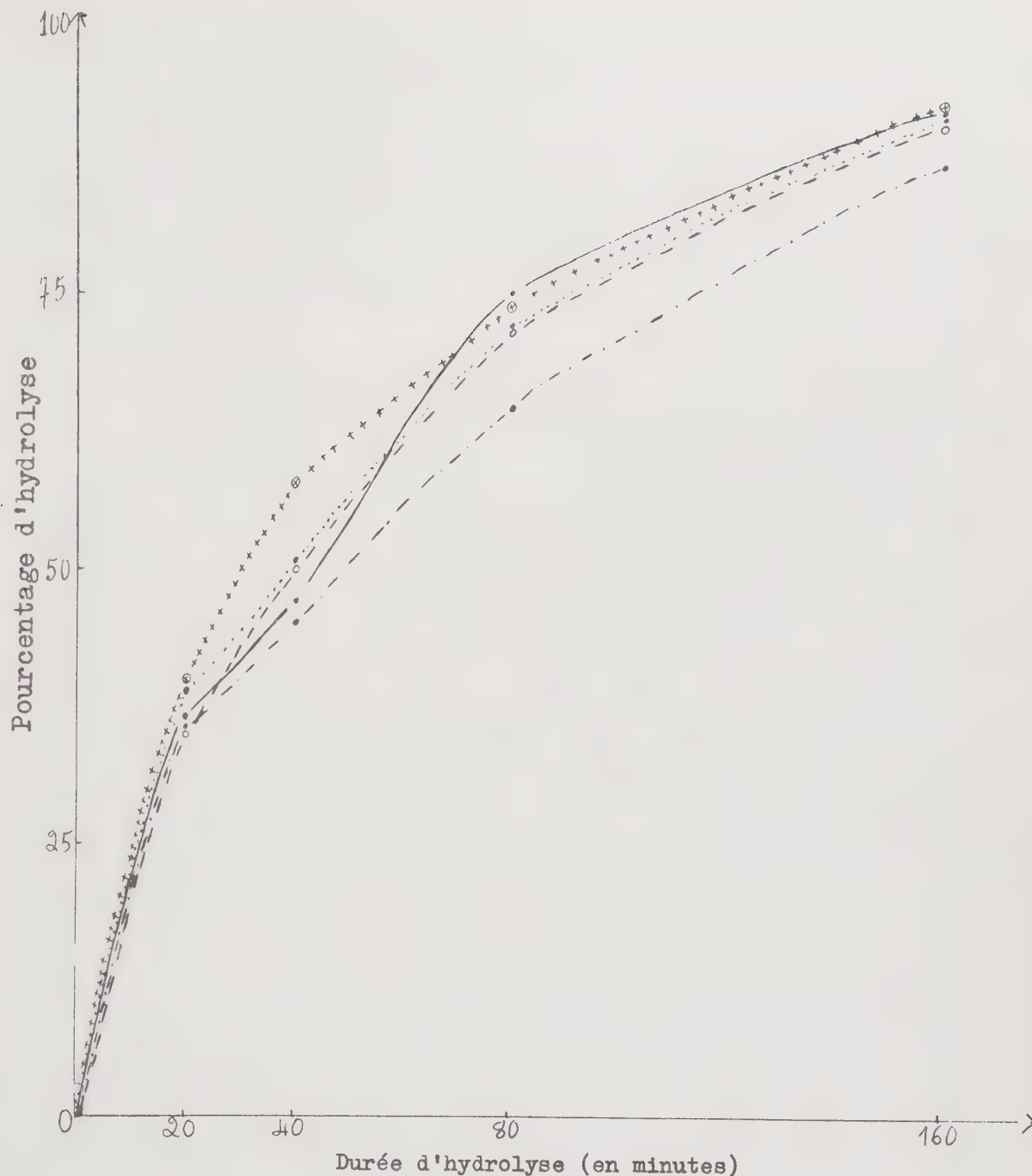


Figure II.

Hydrolyse de l'édessine par 0,25 mg. de pepsine Organotechnie
à pH 2,2 à 37° C.

Hydrolyse calculée :

—————	d'après le phosphore du précipité
.....	d'après l'azote du précipité
+++++	d'après le biuret du précipité
-----	d'après le biuret du liquide surnageant
- . - . -	d'après l'acide phytique titré par les sels ferriques dans le liquide surnageant

Tous les essais ont fourni des résultats analogues; il en a été de même avec un essai réalisé à la température de 30° C et pH 2,2 et un autre à 37° et pH 2,8; l'hydrolyse évoluait moins rapidement dans ces deux cas, mais progressait de façon analogue.

Parallèlement à ces essais, nous avons procédé à des hydrolyses de l'édestine, en fonction du temps, par la pepsine cristallisée Armour. Comme les autres échantillons d'enzyme, la pepsine cristallisée a été desséchée à l'exsiccateur contenant du chlorure de calcium anhydre. Les conditions expérimentales sont les mêmes que dans les essais précédents; nous avons seulement fait varier la dose d'enzyme. D'une part, nous avons mis en contact 25 µg de pepsine avec 50 mg d'édestine; d'autre part, 50 µg de pepsine pour la même quantité de substrat.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

Hydrolyse de l'édécstine en fonction du temps, par la pepsine cristallisée Armour

Durée de l'hydrolyse en minutes	Pepsine cristallisée Armour 25 µg			Pepsine cristallisée Armour 50 µg				
	20	40	80	160	20	40	80	160
Dosage de l'azote du précipité	9,1	15,0	23,8	46,4	31,6	45,6	65,9	72,6
Dosage du phosphore du précipité	10,8	12,9	21,6	45,4	23,7	38,6	54,6	65,6
Biuret du précipité	16,9	20,7	28,7	51,5	25,3	40,5	61,6	64,8
Biuret du liquide surnageant					29,0	38,8	61,4	71,4
Acide phytique titré par les sels ferriques dans le liquide surnageant	7,8	11,6	23,2	50,5	20,3	32,3	52,6	57,4

Ainsi donc, les diverses techniques analytiques conduisent, dans leur ensemble, à des résultats du même ordre de grandeur.

Un examen plus détaillé permet de relever les faits suivants :

1° - Rapport azote phosphore dans les précipités -

Le dosage de l'azote total du précipité conduit presque toujours à des pourcentages d'hydrolyse plus élevés que la détermination de la teneur en acide phytique du même précipité.

La valeur du N_p ou nombre de groupes basiques de la fraction non digérée, s'élève au cours de la réaction, ainsi que l'avait déjà signalé Barré (5). Ce dernier a observé que le N_p initial de l'édestine était de 128-129; après action de la pepsine, la protéine précipitée par l'acide phytique a un N_p qui augmente jusqu'à 140-155. Nos calculs conduisent à des valeurs similaires. Tout se passe donc comme si la dégradation partielle de la molécule d'édestine donnait naissance à une fraction toujours précipitable par l'acide phytique, mais plus riche en groupes basiques que l'édestine initiale. Nous rappelons à ce sujet, que les groupes basiques combinables à l'acide phytique proviennent principalement de l'arginine, de la lysine et de l'histidine.

Dumazert et coll. (30-31) n'ont pas observé de variations du rapport azote/phosphore lors de la digestion de la globine par la pepsine.

L'on admet actuellement, que deux manières extrêmes se présentent à une protéinase pour dégrader un substrat. Ce problème assez complexe est exposé dans diverses revues Fleury et coll. (35) Huguet (51) Lindeström-Lang (59).

Tisclius et Erikson-Quensel ont dénommé ces deux processus :

a) le mode de réaction "un par un", l'enzyme scinde toutes les liaisons peptidiques d'une molécule, avant de s'attaquer à une autre molécule;

b) le mode "zipper" (fermeture-éclair) où l'enzyme réagit en courant d'une molécule à l'autre, dégradant par exemple, une liaison peptidique d'un certain type dans chacune des molécules, avant de rompre un autre type de liaison.

Toutes les réactions enzymatiques de protéolyse sont considérées par Linderström-Lang (59) comme intermédiaires entre ces deux extrêmes.

D'ailleurs, selon la nature du substrat, ou pour un même substrat selon les conditions opératoires (pH, température) l'un ou l'autre des deux modes de réaction devient susceptible de prédominer. Les résultats

de Dumazert et coll. (30-31) tendent à indiquer que la pepsine dégraderait la globine selon le mode "un par un" tandis que le mode "zipper" prédominerait dans l'attaque de l'édestine.

Les dosages de tyrosine sont en faveur de cette interprétation - quelques uns des résultats figurent dans le tableau XV-; si l'on prend comme base la tyrosine dosée lorsque la protéine n'est plus précipitable par l'acide phytique, plus de 50 % de cette quantité se trouvent déjà dans la fraction non précipitée, ceci lorsque les autres modes de détermination indiquent après vingt minutes des pourcentages d'hydrolyse de 25 à 30 %. Pour une hydrolyse de quarante minutes la proportion de tyrosine libérée est encore nettement supérieure à la protéolyse évaluée par la quantité d'acide phytique dans le précipité acide phytique-protéine. Les écarts s'amenuisent comme il est prévisible lorsque la durée de protéolyse augmente. Le tableau XV rend compte de ces faits.

TABEAU XV

Comparaison des résultats obtenus en évaluant les pourcentages d'hydrolyse d'après l'acide phytique précipité et d'après la teneur en tyrosine de la fraction protéique non précipitée.

Temps d'hydrolyse	Expérience A			Expérience B			Expérience C		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
20'	27,7	37	59,3	25	34,5	59,1	26,8	31,6	55,6
40'	36,7	37,6	60,4	44,7	50,9	80,4	43	45,4	69,6
80'	47,1	57,4	69,1	53,7	71,1	87	63	66,7	72,9
160'	85,6	97,8	99,4	89,6	91,5	100	82,1	72,5	100

- a) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le dosage de l'acide phytique dans le liquide surnageant, par la technique aux sels ferriques.
- b) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le taux du phosphore dans le précipité.
- c) Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le dosage de la tyrosine dans le liquide surnageant et calculé par rapport à la tyrosine dosable après protéolyse poussée.

Barré (5) avait observé des faits analogues; il dosa par photométrie à 2.800 Å les amino-acides cycliques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) dans la fraction non précipitable par l'acide phytique; les valeurs obtenues au début de l'hydrolyse étaient supérieures aux pourcentages d'hydrolyse évalués par les autres techniques. Il est bien établi que la pepsine attaque de préférence les liaisons peptidiques où se trouve engagée au moins une molécule de tyrosine : Huguet (51) Linderström-Lang (59) Fleury et coll.(35). Le dosage de la tyrosine de la fraction non précipitée ne semble pas permettre de suivre aussi régulièrement la marche de l'hydrolyse que les autres techniques, moins spécifiques mais plus reliées à l'ensemble de la molécule protéique.

Ainsi, la détermination du rapport azote/phosphore dans le précipité de phytate de protéine, indique que la protéolyse de la globine n'évolue pas comme celle de l'édetine. Il en résulte, au point de vue pratique, que pour l'essai d'une protéase, les résultats obtenus avec un substrat déterminé ne peuvent être transposés directement à un autre substrat.

2° - Réaction du biuret -

Lorsque l'on prolonge la durée de la réaction, la pepsine poursuit son action même lorsqu'il n'y a plus

de substances précipitables par l'acide phytique. Il y a une diminution progressive du taux des liaisons peptidiques évaluées par la réaction du biuret; les corps non précipitables par l'acide phytique, formés par action de la pepsine, paraissent être dégradés plus profondément par la suite. Lorsque l'édestine n'est que partiellement dégradée, ces réactions secondaires ne semblent pas être très importantes; en effet, les valeurs fournies par le biuret du liquide surnageant (tableau XIV) s'intercalent entre celles indiquées par les autres techniques.

3° - Dosage de l'acide phytique en excès -

Nous avons vu que le dosage par les sels ferriques, conduisait à une évaluation rapide de la protéolyse. Il convient de tenir compte que le N_p du précipité acide phytique-protéine s'élève au cours de la réaction; le dosage de l'acide phytique dans le précipité, soit directement par minéralisation, soit indirectement par la technique volumétrique dans le liquide surnageant, conduit à des valeurs plus basses que les autres méthodes, au début de l'hydrolyse; l'écart se réduit progressivement lorsque la réaction se poursuit comme nous l'avons régulièrement observé au cours de ce travail.

- DEUXIEME PARTIE - CHAPITRE VI -

Eléments de choix d'un protocole analytique

Nous avons indiqué que le dosage de la tyrosine conduit à des pourcentages d'hydrolyse plus élevés que ceux indiqués par les autres techniques. Ce dosage ne peut, en effet, que représenter un aspect limité de la protéolyse, l'attaque préférentielle des liaisons peptidiques où la tyrosine est engagée.

Les autres techniques permettent de suivre, d'une façon moins spécifique mais plus générale, la dégradation pepsique de l'édestine. Si ces dosages globaux fournissent des résultats légèrement différents, c'est parce qu'ils traduisent des aspects distincts d'une réaction fort complexe. D'une part, le taux d'acide phytique combiné à la protéine précipitable, correspond à la teneur en groupes basiques de cette protéine. D'autre part, la réaction du biuret sur le précipité indique la proportion de liaisons peptidiques intactes; d'une façon plus anonyme encore, le taux d'azote total du précipité ne représente que la moyenne d'un mélange d'amino-acides combinés par des liaisons peptidiques.

Pour apprécier l'activité d'une préparation pharmaceutique de pepsine, il semble préférable de choisir les techniques les plus rapides et les plus faciles à

exécuter, parmi celles ayant sensiblement la même valeur théorique. A ce dernier point de vue, les deux techniques à préférer seraient donc : le dosage par la réaction du biuret, de la protéine précipitée et le titrage volumétrique de l'excès d'acide phytique. Ces deux dosages sont réalisables au cours de la même expérience, puisque l'un porte sur le précipité et l'autre sur le liquide surnageant. De plus, ils sont rapides l'un et l'autre. En effet, dans le cas du précipité phytique par exemple, point n'est besoin de faire une minéralisation comme lorsque l'on dose le phosphore ou l'azote. Après hydrolyse et séparation de ce précipité, il suffit d'une heure pour effectuer cinq essais. Il faut compter environ 2 fois moins de temps pour doser l'édestine protéolysée, dans le liquide surnageant.

Nous avons donc retenu de préférence ces deux techniques pour étudier la vitesse d'hydrolyse en fonction de la dose d'enzyme. Nous avons utilisé pour ces essais les pepsines A et B provenant des Laboratoires Organotechnie et la pepsine cristallisée Armour.

Influence de la dose de pepsine sur la vitesse d'hydrolyse -

Nous suivons les mêmes conditions expérimentales que précédemment, mais en maintenant la durée de réaction à une heure. L'hydrolyse est appréciée, comme nous venons de l'indiquer, en dosant par la technique du biuret, la protéine non dégradée précipitable par l'acide phytique,

et en déterminant l'excès de cet acide par volumétrie à l'aide des sels ferriques. Nos résultats forment la matière des tableaux XVI et XVII.

Lorsque le pourcentage d'hydrolyse ne dépasse pas 30 %, la vitesse initiale est à peu près directement proportionnelle à la quantité de préparation enzymatique. Ceci concorde avec les lois générales d'action des hydrolases.

La vitesse d'hydrolyse augmente ensuite progressivement avec la dose d'enzyme. Dans une réaction aussi complexe, il ne peut être question de calculer la constante de Wilhelmi des réactions monomoléculaires. Les tableaux XVI et XVII indiquent sans ambiguïté que les techniques basées sur l'emploi de l'acide phytique permettent d'apprécier l'activité de la pepsine. En comparant les résultats fournis par les deux techniques, nous constatons à nouveau, qu'elles traduisent deux aspects légèrement distincts d'un ensemble complexe de réactions. La technique du biuret sur le précipité acide phytique-protéine non digérée fournit des valeurs plus élevées que le titrage de l'excès d'acide phytique; l'écart, assez accentué pour de faibles pourcentages d'hydrolyse, s'amenuise lorsque la protéolyse progresse.

TABLEAU XVI

Hydrolyse de l'édéstine par diverses doses de pepsines A et B Organotechnie
 (Les chiffres du tableau correspondent aux pourcentages d'hydrolyse par rapport
 au substrat initial).

µg de pepsine dans l'essai	Pepsine A Organotechnie			Pepsine B Organotechnie		
	Biuret du précipité	Acide phytique en excès	Biuret du précipité	Acide phytique en excès	Biuret du précipité	Acide phytique en excès
25	1,6	0	17,1	14,5	17,4	
50	5,7	5,3	27,9	26,3	27,2	22
100	9,7	7,9	44,3	34,2	46,1	34,2
200	19,7	14,5	62,7	54	63,8	49,3
400	35,3	32,9	82	79	87	82,4
800			95,6	100		

TABLEAU XVII

Hydrolyse de l'édéstine par des quantités variables de
pepsine cristallisée Armour

(Les chiffres du tableau correspondent aux pourcentages
d'hydrolyse par rapport au substrat initial)

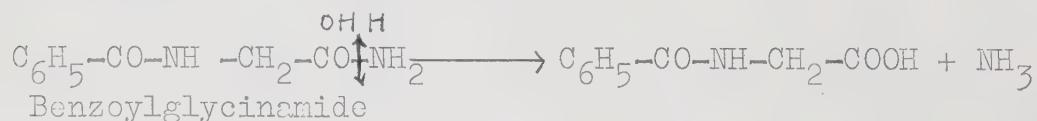
µg de pepsine dans l'essai	20	30	40	50	60	100
Biuret du précipité	25,1	36,0	41,5	48,3	53,1	71,6
Acide phytique en excès	23,0	26,0	34,3	48,8	51,3	63,5

Recherche de la cathepsine éventuellement associée à la pepsine -

En 1947, puis en 1949, Buchs (16-17-18) étudiant l'action du suc gastrique sur une protéine, signala. que la courbe d'activité en fonction du pH présentait deux optimums distincts. Le premier optimum situé vers pH 2 fut attribué à la pepsine, le deuxième, situé vers pH 3,5 - 4,0 à une cathepsine associée.

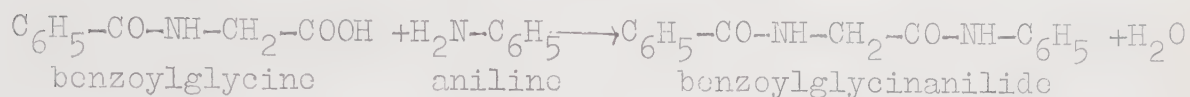
Les cathepsines sont des ferments cellulaires appartenant au règne animal et au règne végétal. On a pu identifier 4 cathepsines animales : la cathepsine I dont l'action est semblable à celle de la pepsine, la cathepsine II se comporte comme la trypsine; la cathepsine III est une leucineaminopeptidase, la cathepsine IV une carboxypeptidase.

Ces enzymes possèdent en commun les propriétés suivantes : leur action s'exerce au voisinage de la neutralité; ils sont activés par l'acide cyanhydrique, l'acide sulfhydrique et les composés sulfhydrylés en général. Ce sont des agents de dédoublement et de synthèse. Les travaux de Irving, Fruton et Bergman (52) qui ont étudié la cinétique de l'hydrolyse de nombreux substrats synthétiques ont permis de préciser le mode d'action des cathepsines. Elles hydrolysent la liaison amide de la benzoylglycinamide



mais sont sans action sur la benzoylglycinanilide.

Inversement, ces enzymes catalysent la synthèse de la benzoylglycinanilide et non celle de la benzoylglycinamide



Enfin, si l'on met en présence, benzoylglycinamide, aniline et cathepsine, il se produit une transamidification : il s'établit un système de deux réactions qui a pour résultat final le remplacement de l'ammoniaque par l'aniline dans la fonction amide.

Selon Buchs, la pepsine et la cathepsine I se rencontrent non seulement dans les préparations commerciales de muqueuse stomacale, mais aussi dans des préparations hautement purifiées de pepsine.

Cependant, divers auteurs : Geilenkirchen et Elbers (38) Crebolder et coll. (27) Tolckmitt (76) n'ont pas admis l'interprétation de Buchs et considèrent qu'il s'agit d'un seul enzyme : la pepsine, laquelle agirait sur certaines liaisons peptidiques de la protéine à un premier pH optimum, et sur d'autres liaisons peptidiques à un second pH optimum.

En faveur de l'existence de deux enzymes distincts, figurent divers arguments présentés par Buchs (17-18) : analogies entre les propriétés de la cathepsine stomacale et de celle des tissus; différences d'activation thermique de la pepsine et de la cathepsine stomacales.

Par contre, Korsgaard-Christensen (55) a présenté des arguments en faveur d'un seul enzyme avec deux pH optimums, la dénaturation avancée des substrats permettant à l'enzyme de réaliser l'hydrolyse dans une zone faiblement acide. Les expériences de Taylor et O'Brien (74) hydrolysant la caséine, la sérum-albumine, l'édestine et la gélatine par le suc gastrique et des extraits de muqueuse stomacale, montrent 2 pH optimums l'un situé entre 1,6 et 2,4 l'autre entre 3,3 et 4,0. Ces 2 pH sont indépendants des solutions tampons utilisés. Cependant il n'y aurait qu'un seul pH optimum quand on emploie l'ovalbumine comme substrat. La pepsine Parke-Davis montre seulement un pH optimum quand elle hydrolyse le plasma et la caséine, la pepsine cristallisée Armour (porc) montre 2 pH optimums.

Ces mêmes auteurs ont utilisé diverses techniques de purification des enzymes, afin de séparer une pepsine dépourvue de cathepsine, et inversement. Leurs essais de fractionnement avec le sulfate d'ammonium et le chlorure de sodium, d'adsorption sur gel de phosphate de calcium, d'échanges d'ions au moyen de résines, d'électrophorèse ne leur ont pas permis de séparer les deux enzymes. Ils concluent "que le suc gastrique et les extraits de la muqueuse stomacale agissent aussi bien à pH 3,2 - 4,0 qu'à pH 2, que l'existence d'une cathepsine est douteuse et que le premier pH peut être une propriété de la pepsine".

L'existence d'une cathepsine n'est donc pas prouvée de façon certaine et n'est surtout pas admise par tous les auteurs.

Nous avons recherché si les techniques basées sur l'emploi de l'acide phytique donnaient la possibilité d'étudier la protéolyse vers pH 4,0.

Nos essais ont été réalisés selon le mode opératoire suivant :

A 2,5 ml de la solution d'édestine à 2 p. 100 (page 47) nous ajoutons 10 ml. d'eau distillée et 2,5 ml du tampon suivant :

acide acétique 2 N : 150 ml. Soude N/1 : 85 ml.

Les réactifs doivent être utilisés dans cet ordre; en effet, lorsque l'on ajoute le tampon directement à la solution d'édestine il se forme un précipité car l'on se trouve à un pH très voisin du point isoélectrique de l'édestine.

Le mélange est porté quelque temps à la température de 37°, puis additionné d'1 ml. de solution de pepsine dans le tampon acide acétique-soude. Nous laissons l'hydrolyse se poursuivre à la température de 37°; nous avons vérifié que le pH du milieu est assez stable : il varie de 4,19 à 4,24.

Après des durées de protéolyse variables selon les cas, nous refroidissons le mélange dans un bain d'eau glacée, puis nous le ramenons à pH 2,3 - 2,5 par addition de 1,2 ml. d'acide chlorhydrique N/1. A ce moment, nous précipitons l'édestine non hydrolysée par l'acide phytique et procédons aux mêmes déterminations que pour les essais à pH 2,2.

Avec la pepsine B Organotechnie, nous avons obtenu les résultats rapportés dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

Hydrolyse de l'édéstine par 0,25 mg de pepsine B à pH 4,2 et à la température de 37°
 Les chiffres du tableau représentent les pourcentages d'hydrolyse par rapport au substrat initial

	1ère série d'essais				2ème série d'essais			
Durée d'hydrolyse	20	40	80	160	20	40	80	160
en minutes	35,7	40,4	43	50,4	34,6	37,4	40,4	49,4
Dosage du phosphore du précipité	32	37,7	41,4	43	25,5	29,2	38	43
Dosage de l'azote du précipité	31,2	35,7	41,3	47,4	34	33,7	43	49
Biuret du précipité	32,5	38,8	43,4	50,9	32	29,4	40	47,6
Acide phytique en excès du liquide surnageant	34,9	39,3	41,5	48,7	39,1	38,5	47,1	51,4

Nous avons réuni dans la figure 3, les résultats du tableau XVIII afin de les comparer avec ceux de la figure 2 obtenus par la même quantité de pepsine mais agissant à pH 2,2.

La comparaison des deux figures montre que l'hydrolyse est nettement plus rapide à pH 2,2; presque totale après 160 minutes à 37° et à pH 2,2 elle n'atteint qu'à peine 50 % pour la même durée à pH 4,2.

D'autre part, l'allure générale des deux courbes est nettement différente; l'hydrolyse évolue de façon régulière à pH 2,2; à pH 4,2 elle débute rapidement, mais dès qu'elle atteint 20 %, elle se poursuit de plus en plus lentement.

On peut envisager plusieurs hypothèses pour interpréter ce ralentissement à pH 4,2 :

1°) il y aurait une hydrolyse sélective de certaines liaisons peptidiques et apparition d'une protéine partiellement dégradée dont les liaisons peptidiques résiduelles ne seraient plus attaquées. Ce résidu serait analogue aux "dextrines limites" résultant de l'action de certaines amylases sur l'amidon; ou au "core" résultant de la dégradation partielle des acides nucléiques.

2°) Nous pouvons aussi supposer que l'enzyme réagissant à pH 4,2 est rapidement inactivé.

3°) Enfin, les produits d'hydrolyse peuvent agir comme inhibiteurs.

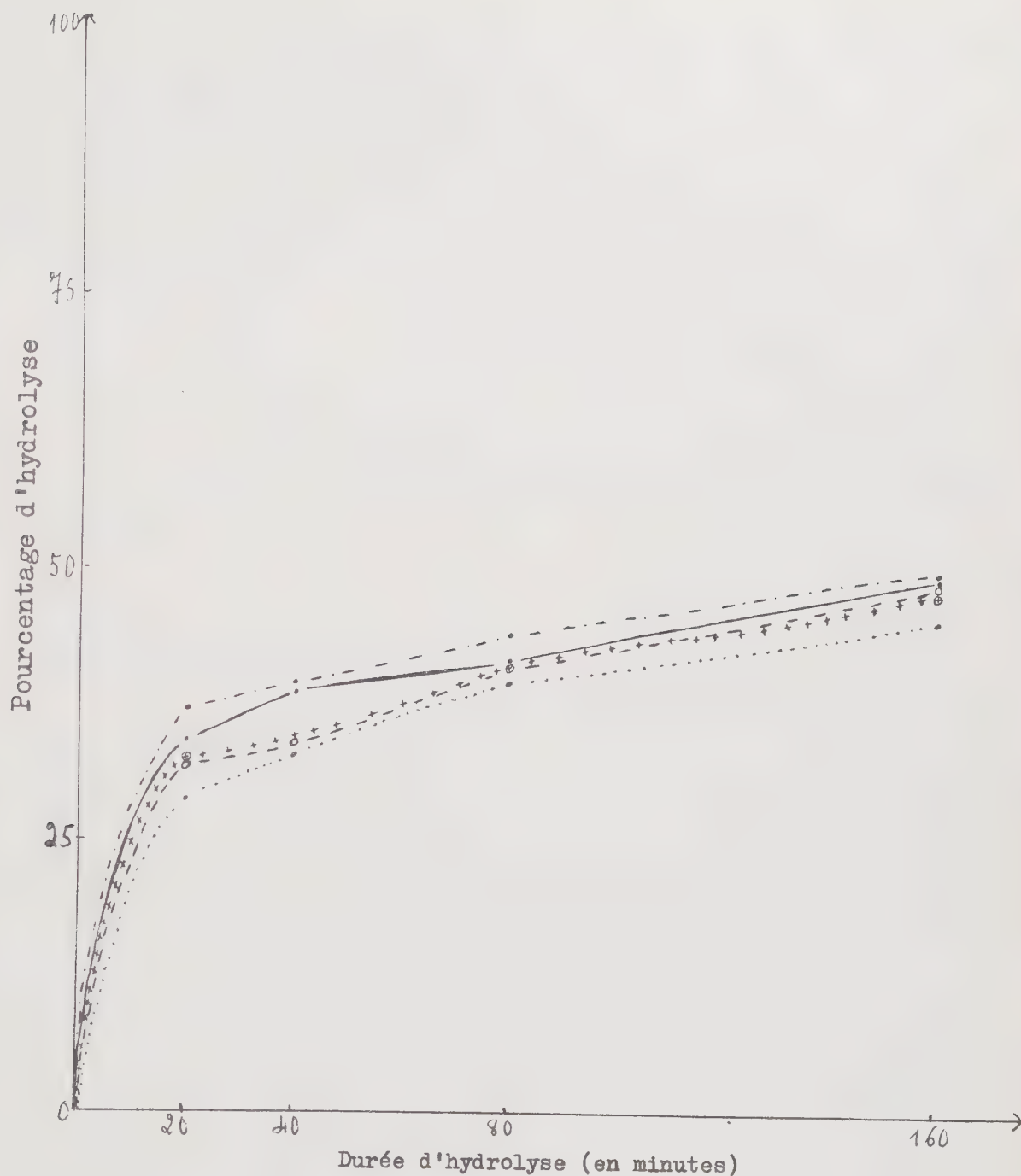


Figure III.

Hydrolyse de l'édessine par 0,25 mg. de pepsine B Organotechnie
à pH 4,2 à 37° C.

Hydrolyse calculée :

- d'après le phosphore du précipité
- d'après l'azote du précipité
- +++++++ d'après le biuret du précipité
- - - - - d'après le biuret du liquide surnageant
- . - . - . d'après l'acide phytique titré par les
sels ferriques dans le liquide surnageant

Afin de résoudre ce problème, nous avons procédé à quelques essais complémentaires.

Dans une première série d'expérience, l'hydrolyse à pH 4,2 est suivie d'une nouvelle hydrolyse à pH 4,2 ou à pH 2,2.

Dans une deuxième série d'expériences, nous faisons varier les quantités de pepsine dans le mélange réactionnel.

Première série d'essais -

Nous préparons un certain nombre de tubes contenant les mêmes doses d'édestine, pepsine et tampon de pH 4,2. Après 160 minutes à 37°, les tubes sont divisés en 3 lots :

- a) le premier lot sert à déterminer les pourcentages d'hydrolyse par les diverses techniques habituelles.
- b) les tubes du deuxième lot sont additionnés d'une nouvelle dose de pepsine (250 μ g).
- c) les tubes du troisième lot sont ramenés à pH 2,2 par addition de 1,2 ml. d'acide chlorhydrique N/1.

Les tubes du deuxième et du troisième lots sont remis à l'étuve à 37° pour une nouvelle hydrolyse de 160 minutes, puis nous procédons à la détermination des pourcentages d'hydrolyse.

Les résultats obtenus constituent la matière du tableau XIX. Ils montrent que, à pH 4,2 l'addition d'une nouvelle dose d'enzyme ne provoque qu'une lente progression de la protéolyse.

Par contre, si l'on revient à un pH plus acide, la pepsine qui est demeurée active, achève pratiquement l'hydrolyse de l'édestine.

TABLEAU XIX

Hydrolyse à pH 4,2 suivie d'une nouvelle hydrolyse à pH 4,2 ou 2,2

Les chiffres du tableau correspondent aux pourcentages d'hydrolyse par rapport du substrat initial

Technique utilisée	Dosage de l'azote du précipité	Biuret du précipité	Biuret du liquide surnageant	Dosage du phosphate du précipité
Hydrolyse de 160 minutes à pH 4,2	40,2	42,2	36,8	42,8
Hydrolyse de 160 minutes à pH 4,2; addition de pepsine et nouvelle hydrolyse à pH 4,2	56,3	52,6	57,2	63,8
Hydrolyse de 160 minutes à pH 4,2; acidification à pH 2,5 et nouvelle hydrolyse à ce pH	95,7	97,2	92,8	99,8

Deuxième série d'essais -

Nous opposons à une quantité constante d'édestine à pH 4,2, des doses variables de pepsine. Les résultats sont rapportés dans le tableau XX.

TABLEAU XX

Hydrolyse à pH 4,2 avec diverses doses de pepsine B Organotechnie
 Les chiffres du tableau indiquent les pourcentages d'hydrolyse
 appréciés par la méthode du biuret a) sur le précipité phytique
 b) sur le liquide surnageant

Durée de réaction (en minutes)	20		40		80		160	
	a	b	a	b	a	b	a	b
0,5 mg de pepsine	31,5	28,5	35,5	35,0	39,5	38,0	49,5	47,6
1 mg de pepsine	47,3	45,3	54,6	54,4	60,7	60,0	67,1	76,2
2,5 mg de pepsine	66,7	71,2	76,0	75,7	82,5	80,0	92,0	100

Avec 0,5 mg. d'enzyme, l'hydrolyse se poursuit très lentement après les vingt premières minutes; avec une dose double de pepsine, l'hydrolyse débute bien plus rapidement et se poursuit lentement après vingt minutes.

Enfin, avec une dose quintuple de pepsine, l'hydrolyse atteint près de 70 % en vingt minutes et devient presque totale après 160 minutes.

Nous pouvons donc conclure tout d'abord

1°) que l'édestine peut être hydrolysée totalement par une préparation de pepsine à pH 4,2; 2°) que cette hydrolyse est beaucoup plus lente qu'à pH 2,2.

D'autre part, la pepsine n'est pas inactivée lorsque l'hydrolyse a lieu à 37° et pH 4,2; en effet, si l'on ramène le pH à 2,2 l'hydrolyse repart après une nouvelle incubation à l'étuve. De plus, les enzymes présentent généralement leur maximum de stabilité à un pH voisin de leur pH optimum; il semble donc difficile d'envisager une destruction de la cathepsine à pH 4,2. Tout ceci est en faveur de la présence d'un seul enzyme.

Le ralentissement de l'hydrolyse observé à pH 4,2 semble pouvoir être attribué à l'inhibition par les produits d'hydrolyse. À pH 4,2, proche du point isoélec-

trique, les groupements carboxylés de la pepsine peuvent salifier les groupements aminés des produits d'hydrolyse; la salification des groupements basiques de la pepsine par les carboxyles des produits d'hydrolyse est bien moins importante, la pepsine riche en groupements carboxylés est pauvre en groupes basiques. Ainsi, les produits d'hydrolyse seront susceptibles de se combiner à pH 4,2 aux fonctions acides de la pepsine et de l'inhiber. Cette inhibition n'apparaîtra pas en milieu de pH 2,2; l'acide chlorhydrique du tampon salifie les fonctions amines des produits d'hydrolyse, d'où la légère élévation du pH au cours de la réaction. A pH 2,2 les carboxyles de la pepsine sont libres et, de ce fait, ne sont plus combinés aux produits d'hydrolyse.

Ainsi, les essais à pH 4,2 ne fournissent aucun argument en faveur de l'existence de deux enzymes distincts : leur interprétation est plus aisée si l'on admet l'existence d'un seul enzyme avec 2 pH optimums. L'appréciation de l'activité protéolytique est seulement plus difficile à pH 4,2 qu'à pH 2,2; il faut, en effet, se placer dans des conditions opératoires permettant de mesurer la vitesse initiale, ceci de façon à limiter au minimum l'inhibition par les produits d'hydrolyse.

- DEUXIEME PARTIE - CHAPITRE VII -

Eléments d'un choix du mode d'expression des résultats

Nous avons vu (page 27 et suivantes), que l'activité des diverses préparations de pepsine est évaluée en unités arbitraires, qui ne sont pas comparables d'une technique à l'autre. Les unités du Codex 1937 par exemple, ne peuvent être comparées à celles de la méthode Mett.

D'autre part, pour une technique déterminée, les conditions opératoires doivent être rigoureusement identiques d'une expérience à l'autre. Les difficultés d'appréciation sont encore plus grandes quand il s'agit de pepsines provenant de différentes pharmacopées. Leurs unités n'ayant pas de dimensions au sens physique du mot, ne peuvent se comparer entre elles. Dès 1929, Legrand (58) attira l'attention sur l'avantage que présenterait l'emploi d'une unité identique pour les pepsines des différentes pharmacopées.

Il serait donc souhaitable de rapporter l'activité des préparations de pepsine à celle d'un échantillon de référence : pepsine cristallisée de Northrop par exemple. Le titre des pepsines commerciales indiquerait ainsi la proportion de pepsine de référence qu'elles contiendraient.

Pour évaluer l'activité d'une pepsine commerciale en pepsine standard on pourrait suivre le protocole opératoire ci-dessous :

- Déterminer le pourcentage d'hydrolyse de l'édés-tine par x μ g de pepsine étalon avec différentes durées de réaction. Porter en abscisses le temps d'hydrolyse et en ordonnées les pourcentages, puis dessiner la courbe figurative. Tirer une parallèle à l'axe des abscisses en prenant pour ordonnée 25 % d'hydrolyse; nous avons vu en effet que, pour titrer une pepsine par une technique basée sur l'acide phytique, les mesures d'activité doivent être réalisées dans les conditions où l'on apprécie la vitesse initiale de la protéolyse. Du point d'intersection de la parallèle et de la courbe représentative, abaisser la perpendiculaire, elle rencontrera l'axe des abscisses en un point correspondant au temps t_1 nécessaire pour obtenir 25 % d'hydrolyse.

Etablir selon les mêmes conditions opératoires la courbe d'activité en fonction du temps avec y μ g de pepsine à étalonner; soit t_2 le temps nécessaire pour atteindre une hydrolyse de 25 %. Le rapport $\frac{t_1 \times x}{t_2 \times y} \times 100$ représentera le pourcentage de pepsine étalon dans la préparation à doser.

- Un deuxième protocole opératoire en accord avec les normes de l'enzymologie pourrait être le suivant : on prépare une solution de pepsine de concentration connue et on détermine la dose de pepsine étalon qu'elle contient. C'est cette deuxième possibilité que nous avons retenue.

Nous avons ainsi étudié selon le mode opératoire indiqué page 58, l'activité de la pepsine cristallisée Armour en fonction de sa concentration. Avant pesée, la pepsine est desséchée jusqu'à poids constant, à la température du laboratoire, dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium anhydre. Comme dans le cas des pepsines commerciales, la pepsine Armour est dissoute pour l'essai dans le tampon R_2 .

Avec diverses concentrations de pepsine de référence, comprises entre 10 μg et 200 μg nous avons pu tracer la courbe d'hydrolyse 4. La durée de l'hydrolyse a été dans chaque essai de 60 minutes. Les résultats obtenus sont d'autre part, rassemblés dans le tableau XXI. Ils montrent que les courbes d'hydrolyse de l'édestine par la pepsine Armour sont facilement reproductibles. C'est pour cette raison que nous avons retenu cette technique pour l'évaluation de l'activité protéolytique du suc gastrique.

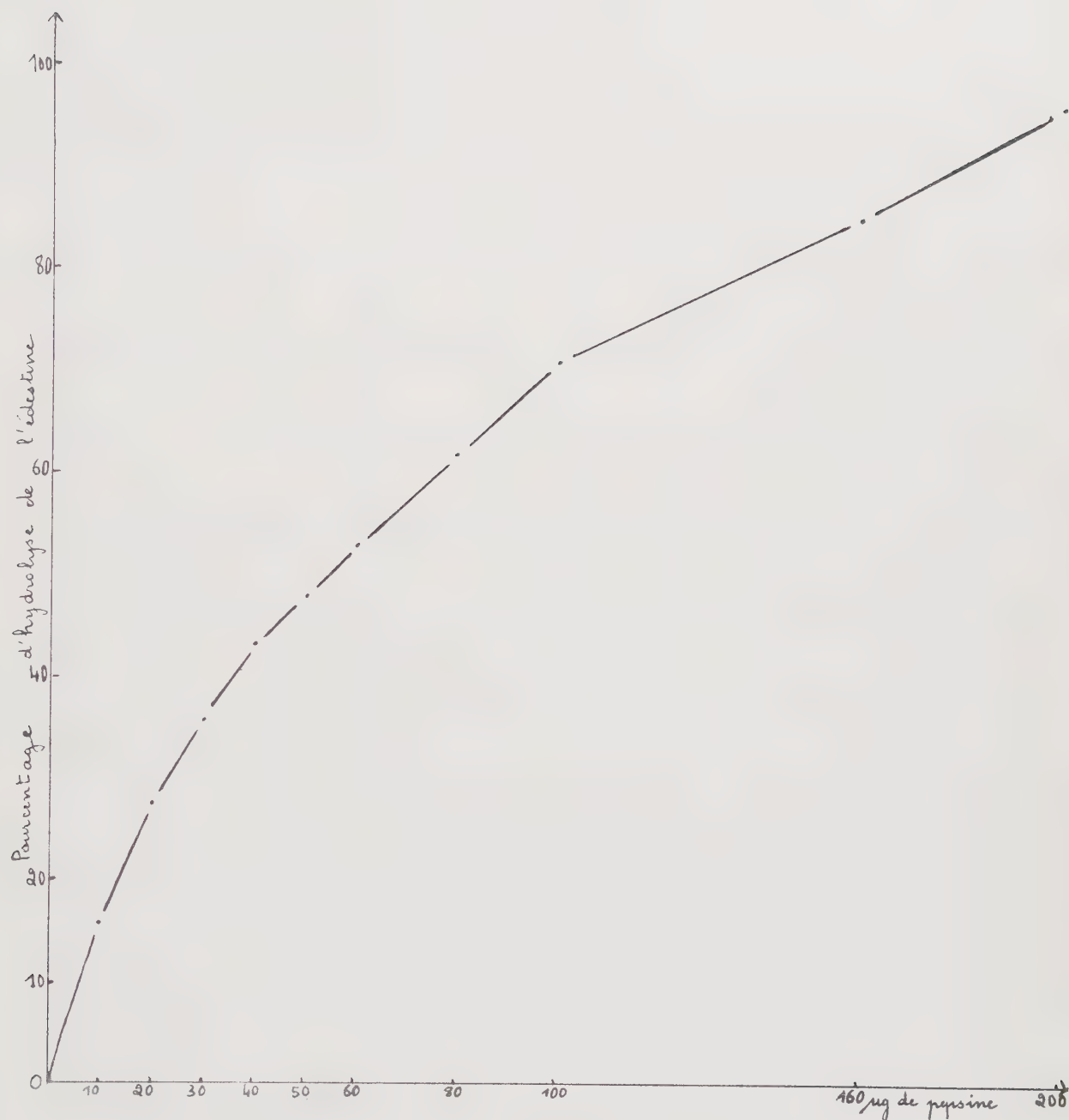


Figure IV.

Hydrolyse de l'édestine par des quantités croissantes de pepsine cristallisée Armour, 1 heure à 37° C; pH 2,2; protocole opératoire de la technique proposée.

TABLEAU XXI

Hydrolyse de l'édestine par la pepsine Armour à différentes concentrations

Quantité de pepsine en μg	Pourcentage d'hydrolyse calculé d'après le biuret du précipité phytique.			
	I (1)	II	III	IV
10	15,7	15	15,5	16,6
20	25,1	29,1	26,2	29,4
30	36	35,5		
40	41,5	44	43,5	43,5
50	48,3	47,8		
60	53,1			
80			62,4	61,8
100	71,6	71,2		
160			85,7	85
200			99	93,8

(1) I - II - III - IV correspondent à des séries d'essais réalisés séparément avec des échantillons différents des réactifs utilisés pour l'hydrolyse et pour le dosage.

TROISIEME PARTIE

Applications à la chimie clinique

TROISIEME PARTIE

Applications à la chimie clinique

Emploi de l'acide phytique pour déterminer l'activité de la pepsine du suc gastrique -

La plupart des techniques utilisées pour la détermination de l'activité des pepsines commerciales, ont été appliquées au suc gastrique. Nous les avons brièvement rappelées dans la première partie de ce travail page 33-34.

Nous avons voulu appliquer au suc gastrique la technique utilisant la précipitation par l'acide phytique de l'édestine non digérée, et nous avons évalué l'intensité de la protéolyse par la réaction colorée dite du biuret. Nous avons choisi cette technique de préférence aux autres car elle est très simple et très rapide. De plus, elle est entrée dans la pratique courante des laboratoires de chimie clinique et ne nécessite pas un matériel compliqué.

Nous rappellerons brièvement la marche à suivre, puis nous exposerons nos résultats.

Technique -

Nous faisons agir le suc gastrique sur une solution tamponnée d'édestine. Après une heure de contact à 37° à un pH voisin de 2,2, la protéine non digérée est précipitée en milieu acide, par l'acide phytique. Le précipité est séparé

par centrifugation et traité par le réactif au biuret selon le protocole mis au point par Fleury et Eberhard. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'édestine non hydrolysée.

La solution d'édestine et la solution tampon utilisées sont les mêmes que celles employées pour l'essai des échantillons commerciaux de pepsine page 57. La formule de la solution d'acide phytique $\frac{M}{20}$ en phosphore est décrite page 47, et le réactif cupro-tartrique page 61.

Prélèvement du suc gastrique .-

Tous les sucs gastriques utilisés ont été obtenus par tubage à l'aide de la sonde d'Einhorn préalablement stérilisée, et d'une seringue de 20 ml. munie de son embout.⁽¹⁾ Les prélèvements ont été faits le matin, chez des sujets à jeun depuis la veille au soir. Il n'a pas été procédé à des lavages d'estomac.

Les sucs ainsi obtenus ont été filtrés sur papier ou centrifugés. La teneur en pepsine du suc gastrique étant assez variable, nous procédons à deux essais simultanés avec deux dilutions différentes du suc.

(1) Nous sommes heureux de présenter ici nos remerciements à Monsieur M. Masson Chef de laboratoire des Hôpitaux de Paris, qui nous a obligeamment procuré les échantillons de sucs gastriques nécessaires à nos essais.

Les expériences préliminaires ont indiqué que dans nos conditions opératoires, les essais peuvent être réalisés avec soit 1 ml. de dilution au $1/10^0$, soit 1 ml. de dilution au $1/100^0$.

Nous diluons le suc gastrique dans la solution tampon immédiatement avant l'essai enzymatique.

Hydrolyse enzymatique -

Quatre tubes à centrifuger à fond conique, d'une capacité de 45 ml. sont numérotés respectivement : I_a , I_b , II, III. Il faut utiliser des tubes stériles ou à défaut des tubes très propres passés à l'étuve à $100-110^0$.

Dans ces tubes nous mesurons dans l'ordre suivant

Numéro du tube	I_a et I_b	II	III
Solution d'édestine à 2 %	2,5 ml.	0	2,5 ml.
Solution tampon	2,5 ml.	2,5 ml.	2,5 ml.
Eau distillée	10 ml.	12,5 ml.	11 ml.

Les tubes sont plongés jusqu'au col pendant 30 minutes dans un bain-marie maintenu à 37^0 ; nous introdui-

sons ensuite 1 ml. de suc gastrique dilué au dixième dans les tubes I_a et II et 1 ml. de suc gastrique dilué au centième dans le tube I_b . Il n'est pas ajouté de suc au tube III. Une légère agitation circulaire assure le mélange de l'enzyme introduit.

Nous maintenons les tubes pendant exactement une heure au bain-marie à 37°; le pH du milieu réactionnel est voisin de 2,2. Après une heure d'hydrolyse, nous refroidissons rapidement les tubes dans l'eau glacée afin de réduire au minimum la poursuite de l'hydrolyse pepsique. Nous mesurons alors dans chaque tube 2,5 ml. de solution d'acide phytique $\frac{M}{20}$ en phosphore et complétons à 20 ml. avec de l'eau distillée. Les tubes sont ensuite maintenus pendant trente minutes dans un frigidaire.

L'addition d'acide phytique provoque un louche immédiat dans le tube III; le louche est plus ou moins intense dans les tubes I_a et I_b selon l'intensité de la protéolyse. Le tube II sert de témoin et a pour but d'indiquer la proportion de protéines apportées par le suc gastrique; la plupart du temps, nous n'avons pas observé de précipité dans le tube II; dans ces cas, il n'y a pas d'élément de correction à prévoir et il devient inutile de poursuivre les essais avec le tube II.

Après contact de trente minutes avec la solution d'acide phytique, nous centrifugeons pendant 10 minutes à

6.000 tours; le liquide surnageant est décanté et le tube retourné sur des feuilles de papier filtre pour éliminer les dernières gouttes de liquide.

Nous dissolvons alors le précipité dans 3 ml. de soude à 1 % à l'aide d'un agitateur, puis transvasons dans un flacon jaugé de 10 ml. et après avoir lavé 2 fois les tubes avec la même solution de soude, nous complétons à 10 ml.. La solution est généralement aidée; quand elle s'avère difficile on peut tiédir les tubes dans un bain-marie.

A 1 ml. de cette solution sodique de protéine, nous ajoutons 4 ml. du réactif cupro-tartrique. Nous laissons la coloration se développer 20 minutes à la température du laboratoire, puis nous apprécions l'intensité de la coloration au photocolorimètre Bonet-Maury à la longueur d'onde de 530 Å, filtre vert.

De la valeur obtenue pour les tubes en expériences, nous retranchons l'absorption initiale d'un témoin constitué par le mélange de 4 ml. de réactif cupro-tartrique et 1 ml. de soude à 1 pour 100.

Soit a_1 l'absorption par la solution provenant du tube I_a
 a_2 l'absorption correspondant au tube I_b
 b l'absorption correspondant au tube II (souvent nulle)
 c l'absorption du tube III,

$c + b - a_1$ correspond à l'absorption de la fraction d'édestine hydrolysée; le pourcentage d'hydrolyse p_1 dans le tube I_a sera donc :

$$p_1 = \frac{(c + b) - a_1}{c} \times 100$$

et dans le tube I_b :

$$p_2 = \frac{(c + \frac{b}{10}) - a_2}{c} \times 100$$

Le pourcentage d'hydrolyse est évalué par rapport à l'absorption de la solution d'édestine non soumise à l'action de la pepsine dans le tube III. L'intensité de la coloration avec le réactif cupro-tartrique est directement proportionnelle à la concentration en édestine.

Nous avons souvent évalué l'édestine non hydrolysée des tubes I_a et I_b par rapport à une courbe d'étalonnage, cette courbe étant établie avec des dilutions de la solution mère d'édestine contenant de 0,5 à 5 milligrammes d'édestine par ml. et additionnées de 4 ml. de réactif cupro-tartrique. Nous avons reproduit page 63 une courbe d'étalonnage, 5 milligrammes d'édestine représentant la quantité d'édestine mélangée au réactif du biuret dans l'essai du tube III.

Si la comparaison avec la courbe d'étalonnage indique x_1 mg. d'édestine dans 1 ml. de dilution provenant du tube I_a , x_2 pour 1 ml. de la dilution du tube I_b et

y pour 1 ml. de la dilution à partir du tube **II**, les pourcentages d'hydrolyse seront :

pour l'essai I_a :

$$p_1 = \frac{(5 + y) - x_1}{5} \times 100 = 20 \left[(5 + y) - x_1 \right]$$

pour l'essai I_b :

$$p_2 = 20 \left[\left(5 + \frac{y}{10} \right) - x_1 \right]$$

Nous avons parfois obtenu une hydrolyse complète de l'édestine dans le tube I_a avec des sucs très riches en pepsine; dans ces conditions, l'essai I_b était seul valable pour apprécier l'activité du suc; dans le cas douteux mais possible d'une protéolyse totale dans le tube I_b , il convient de procéder à une nouvelle série d'essais avec des dilutions de suc au $1/200^e$ ou au $1/400^e$; au besoin, on utilisera une dilution plus grande encore.

Nous verrons plus loin les résultats obtenus avec différents sucs gastriques. Nous indiquerons cependant dès à présent que l'activité pepsique des divers sucs utilisés est extrêmement variable. Certains d'entre eux nous ont donné un pourcentage d'hydrolyse important, étant dilués au $1/100^e$; d'autres au contraire, étaient dépourvus de toute activité hydrolysante sur l'édestine.

Mode d'expression des résultats -

Dès 1933, Ege et Menck-Thygesen (32) ont proposé d'exprimer l'activité du suc gastrique par sa concentration en pepsine. C'est ce mode d'expression qu'a adopté Bock; il opère par comparaison avec l'activité d'une pepsine cristallisée standard, General Biochemical Industries, ce qui lui permet de calculer l'équivalence en milligrammes de cette pepsine du suc analysé.

Nous avons utilisé le même mode d'expression logique des résultats. Dans ce but, nous avons apprécié selon notre protocole, l'activité de diverses dilutions d'une solution de pepsine cristallisée Armour.

Nous avons exposé page 115 la préparation de cette solution et nous avons reproduit page 116 une courbe d'étalonnage (Fig. 4).

Résultats -

Nous avons tout d'abord recherché si, avec le même suc à des dilutions variables, les teneurs en pepsine calculées par rapport à la courbe de la pepsine de référence Armour étaient du même ordre de grandeur.

Les résultats du tableau XXII correspondent à deux sucs d'activité pepsique assez faibles, ceux du tableau XXIII à une série de dilutions avec un suc très actif.

TABLEAU XXIII

Teneur en pepsine appréciée d'après les dilutions d'un suc très actif.
Echantillon 3 B.M.

Dilution du suc	1/1	1/2	1/4	1/5	1/10	1/20	1/25	1/50	1/100
Pourcentage d'hydro- lyse de l'édéstine	100	97,8	98,2	98,2	87,6	68,2	58,5	37,8	24,3
Teneur en pepsine du suc non dilué (en mg/ml)	0,20	0,204x2 ↓ 0,408	0,205x4 ↓ 0,820	0,205x5 ↓ 1,025	0,168x10 ↓ 1,68	0,094x20 ↓ 1,88	0,072x25 ↓ 1,80	0,031x50 ↓ 1,55	0,017x100 ↓ 1,70

Les résultats de ces tableaux indiquent que lorsque les pourcentages d'hydrolyse sont inférieurs à 80 %, la dilution du suc permet de retrouver des teneurs en pepsine du même ordre de grandeur. Il existe cependant d'assez nets écarts, qui tendraient à indiquer que les substances présentes dans le suc peuvent interférer, car le suc dilué ne se comporte pas exactement comme la dilution d'une solution de pepsine purifiée.

Comme nous l'avons brièvement indiqué plus haut, nous avons observé de notables différences d'activité suivant les sucs étudiés. C'est ce qui nous a amené à faire un essai avec la dilution au $1/10^e$ et un autre avec la dilution au $1/100^e$ de façon que l'un au moins des deux essais fournisse un pourcentage d'hydrolyse permettant de fixer l'ordre de grandeur de la teneur en pepsine du suc initial.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau XXIV.

TABLEAU XXIV

Teneur en pepsine de divers échantillons de suc gastrique.

Référence de l'échantillon	3 F.P.	4 H.	5 G.	6 R.	7 G.U.	8 D.P.	9 J.P.
Dilution							
au							
dixième							
	Pourcentage d'hydrolyse :						
	de l'édèstine :	95,6	62,5	86,1	30,4	82,0	59,0
	Teneur en pepsine du						
	suc non dilué (en mg/ml) :	1,97	0,81	1,63	0,235	1,43	0,72
Dilution							
au							
centième							
	Pourcentage d'hydrolyse :						
	de l'édèstine :	40,0	7,5	30,1	1,3	20,5	10,9
	Teneur en pepsine du						
	suc non dilué (en mg/ml) :	3,6	0,45	2,3	0,1	1,3	0,62

Ainsi, l'activité des sucs étudiés s'échelonne, si l'on tient compte des essais ou les pourcentages d'hydrolyse sont inférieurs à 80 p. 100, entre 0,1-0,2 milligramme de pepsine et 3,6 millig. par ml.

Bock (13) analysant 14 sucs gastriques selon sa méthode, a obtenu les résultats du tableau XXV :

TABLEAU XXV	
Taux de pepsine dans le suc gastrique de l'homme (d'après Bock).	
(les chiffres du tableau indiquent la quantité de pepsine standard (1 : 1000 General Biochemical Industries) par ml. de suc gastrique)	
Echantillon	mg. de pepsine
1	1,6
2	2,7
3	1,5
4	2,2
5	1,3
6	2,7
7	2,3
8	2,2
9	1,8
10	2,1
11	1,7
12	1,3
13	0,0
14	1,3

L'examen de ce tableau montre, si l'on excepte l'échantillon n° 13, que les teneurs des sucs gastriques s'étagent entre 1,5 et 2,7 milligrammes de la pepsine de référence par ml. de suc. Ces valeurs s'intercalent entre celles que nous indiquons. L'échantillon n° 13 de Bock est dépourvu de toute activité. Sur les 19 échantillons provenant de personnes différentes, que nous avons analysés, 6 étaient dépourvus d'activité hydrolysante sur l'édestine. Nous avons observé ceci aussi bien sur le suc non dilué que sur des dilutions au $1/10^0$ et au $1/100^0$.

Nous avons pu vérifier que ces sucs inactifs ne renfermaient pas un inhibiteur de la pepsine et qu'inversement, les sucs actifs ne renfermaient pas un activateur susceptible de faire apparaître une activité pepsique dans le suc inactif.

Pour des mélanges à volumes égaux d'un suc inactif et d'un suc actif, le pourcentage d'hydrolyse est sensiblement identique à celui obtenu avec la même quantité de suc actif.

Ainsi, 1 ml. de suc dilué au $1/10^0$ (échantillon Fa) provoque une hydrolyse de 96,8 %; mélangé à 1 ml. de suc dilué au $1/10^0$ inactif (échantillon Co) l'hydrolyse est de 96,1 %.

Le tableau XXVI rend compte de ces faits.

TABLEAU XXVI

Hydrolyse par des mélanges de suc gastrique actif
et de suc inactif.

Suc actif	Suc inactif	Mélange
Hu 100 % (1)	Ge 0	Hu + Ge 100 %
Pa 96,8 %	Co 0	Pa + Co 96,1 %
Go 28,2 %	Bl 0	Go + Bl 29 %
Paq 44,6 %	Cl 0	Paq + Cl 47,2 %

(1)

Les chiffres du tableau correspondent aux pourcentages d'hydrolyse.

Nous pouvons conclure de tout ce qui précède que :

- 1°) la technique proposée pour évaluer l'activité protéolytique des pepsines commerciales convient également pour déterminer la pepsine du suc gastrique.
- 2°) Etant donné les grandes variations du taux de la pepsine gastrique, il est préférable d'effectuer deux essais parallèles avec deux dilutions différentes du suc analysé.
- 3°) Les sucs gastriques actifs ne renferment pas d'activateur susceptible d'agir sur les sucs inactifs; inversement ces derniers ne renferment pas d'inhibiteur.

C O N C L U S I O N S

Nous nous sommes proposé de rechercher s'il était possible d'utiliser l'acide phytique pour apprécier quantitativement l'activité de la pepsine.

L'acide phytique (mesoinositol hexaorthophosphorique) précipite en milieu acide les protéines sans insolubiliser les produits de leur protéolyse pepsique.

Nous avons comparé les diverses possibilités analytiquesque permet l'emploi de la précipitation phytique.

a) pour le précipité acide phytique-protéine, détermination du phosphore, de l'azote total ou des liaisons peptidiques par le biuret.

b) pour le liquide surnageant le précipité :
détermination de l'acide phytique en excès (teneur en phosphore total ou volumétrie par les sels ferriques) - détermination des produits solubles de la protéolyse d'après leur teneur en tyrosine (colorimétrie selon Folin) ou en liaisons peptidiques (colorimétrie du biuret).

Parmi ces techniques, les plus simples et les plus rapides sont :

a) Dosage colorimétrique par la réaction du biuret, de l'édestine non protéolysée dans le précipité formé par l'acide phytique.

b) Titrage volumétrique par les sels ferriques de l'excès d'acide phytique qui n'a pas précipité avec la fraction protéique non protéolysée.

Nous avons pu vérifier qu'à pH 2,2 la protéolyse progresse régulièrement avec le temps; la vitesse initiale de réaction est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme mise en oeuvre ce qui permet d'évaluer l'activité des pepsines commerciales.

A pH 4,2 les produits de la réaction inhibent la protéolyse. Celle-ci repart si l'on ramène le pH à 2,2 par addition d'acide chlorhydrique.

Nous avons étudié par ces mêmes techniques, l'hydrolyse de l'édostine par la pepsine purifiée Armour en fonction de la concentration d'enzyme. Nous proposons de définir l'activité des préparations commerciales de pepsine d'après leur teneur en pepsine, une pepsine hautement purifiée étant utilisable comme échantillon de référence.

Enfin, nous avons montré que la technique proposée pour l'essai des pepsines officinales peut être aussi appliquée au suc gastrique de l'homme. L'édostine non protéolysée est précipitée par l'acide phytique et dosée par la technique colorimétrique du biuret. En réalisant deux essais parallèles avec deux dilutions différentes du suc analysé, il est possible de fixer l'ordre de grandeur de la teneur en pepsine du suc examiné.

Les sucs gastriques analysés montrent de grandes variations d'activité. Certains sucs sont inactifs, l'addition d'un suc actif ne leur confère aucune activation.

Vu :

Le Président de Thèse :
Jean Emile COURTOIS

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie :
René FABRE

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris :
Jean SARRAILH

B I B L I O G R A P H I E.

1. - ANDERSON (R.J.) - Journ. Biol. Chem., 1914, 17, 141.
2. - ANDREWS (J.S.) et BAILEY (C.H.) - Journ. Ind. Eng. Chem.
1932, 24, 80.
3. - ANSON (M.L.) - Journ. Gen. Physiol., 1938-39, 22, 79.
4. - ANSON (M.L.) et MIRSKY (A.E.) - Journ. Gen. Physiol.,
1933, 16, 59.
5. - BARRE (R.) - Ann. Pharm. Franç., 1956, 14, 182.
6. - BARRE (R.) et COURTOIS (J.E.) - Ann. Pharm. Franç.,
1953, 11, 153.
7. - BARRE (R.) et COURTOIS (J.E.) - Bull. Soc. Chim. Biol.
1953, 35, 921.
8. - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.), DELRIEU (P.) et PERLES (R.) -
Ann. Pharm. Franç., 1954, 12, 601.
9. - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.), DELRIEU (P.) et PERLES (R.) -
Ann. Biol. Clin., 1954, 12, 501.
10. - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.) et WORMSER (G.) -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 455.
11. - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.) et WORMSER (G.)
Ann. Acad. Sc. Fenn. S.A. II Chemica,
1955, 60, 104.
12. - BERGMANN (M.) et ZERVAS (L.) - Zeitschr. Physiol. Chem.,
1934, 224, 11.
13. - BOCK (J.) - Scand. Journ. Clin. Lab. Investig., 1954, 6, 237
14. - BORSALINO, SEMERIA (P.) - Biochim. Terap. Sperim.,
1933, 20, 533.
15. - BOULANGER (P.) - Exp. Ann. Bioch. Med., 1951, 12^e série, 178.
16. - BUCHS (S.) - Die Biologie des Magenkathepsins Basel :
Karger 1947.

17. - BUCHS (S.) - Enzymologia, 1949, 13, 208.
18. - BUCHS (S.) - Enzymologia, 1953, 16, 193.
19. - BUTLER (J.A.V.), DODDS (E.C.), PHILLIPS (D.M.P.) et STEPHENS (S.M.L.) - Nature, 1948, 162, 418.
20. - BUTLER (J.A.V.), DODDS (E.C.), PHILLIPS (D.M.P.) et STEPHENS (S.M.L.) - Biochem. Journ., 1948, 42, 22.
21. - CHRISTENSEN (L.R.) - Journ. Gen. Physiol., 1945, 28, 363.
22. - CORTESI (R.) - Thèse Pharm. Sup. Paris, 1938.
23. - COURTOIS (J.E.) - Revis. Espan. Fisiol. 1957, 13, 59.
24. - COURTOIS (J.E.) et BARRE (R.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 740.
25. - COURTOIS (J.E.) et BARRE (R.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 913.
26. - COURTOIS (J.E.), DESJOBERT (A.) et FLEURENT (P.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, 691.
27. - CREBOLDER (A.J.M.), ENGEL (C.) et OTTEN (C.J.) - Enzymologia, 1951, 15, 103.
28. - CULTRERA (R.) et DE LUCA (G.) - Ann. Chim. Appl., 1947, 37, 141.
29. - DESNUELLE (P.), ROVERY (M.) et BONJOUR - Biochem. Biophys. Acta, 1950, 5, 116.
30. - DUMAZERT (C.), GHIGLIONE (C.) et BOZZI-TICHADOU (M.), Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 403.
31. - DUMAZERT (C.), GHIGLIONE (C.) et BOZZI-TICHADOU (M.), Comp. Rend. Soc. Biol., 1956, 150, 1589.
32. - EGE (R.) et MENCK-THYGESEN (P.) - Biochem. Ztschr., 1933, 264, 13.
33. - FLEURY (P.) - Fiches Techniques de Chimie Biologique Paris 1955, Vega Ed.
34. - FLEURY (P.) et LECLERC (M.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1943, 25, 201.
35. - FLEURY (P.), COURTOIS (J.E.) et PERLES (R.) - "Protéases", in traité de Biochimie générale de M. POLONOVSKI, M. JAVILLIER et P. BOULANGER. II Masson, édit. à l'impression.

36. - FOLIN (O.) et CIOCALTEU (V.) - Journ. Biol. Chem.,
1927, 73, 629.
37. - FULD (E.) et LEVISON (L.A.) - Biochem. Ztschr.,
1907, 6, 473.
38. - GEILENKIRCHEN (W.L.M.) et ELBERS (P.F.) -
Enzymologia 1951, 14, 304.
39. - GORIS (Al.), LIOT (A.), JANOT (M.) et GORIS (An.)
Traité de Pharmacie Galénique 1949 Masson Edit.
40. - GOTTLIEB (E.) - Comp. Ren. Soc. Biol., 1924, 90, 1172.
41. - GRASSMANN (W.) - in Oppenheimer Handb. der Biochemie
des Menschen und der Tiere 1930 175.
42. - GUILLEMET (R.) - Biol. Medic. 1946, 35, 88.
43. - HEIDELBERGER (M.) et MacPherson (C.F.C.) -
Science, 1943, 97, 405.
44. - HERRIOTT (R.M.) - Proc. Soc. Exp. Biol., 1914, 46, 642.
45. - HERRIOTT (R.M.), BARTZ (Q.M.) et NORTHROP (J.H.) -
Journ. Gen. Physiol., 1938, 21, 575.
46. - HERRIOTT (R.M.) et NORTHROP (J.H.) -
Journ. Gen. Physiol., 1934, 18, 36.
47. - HEUBNER (W.) - Biochem. Ztschr., 1914, 64, 401.
48. - HEUBNER (W.) et STADLER (H.) - Biochem Ztschr.,
1914, 64, 422.
49. - HILL (R.) et TYLER (C.) - Journ. Agric. Sc.,
1954, 44, 324.
50. - HOUSSAY (A.) - Physiologie humaine. Traduct. Laroche C.
Flammarion Edit.
51. - HUGUET (R.) - Thèse Doct. Pharm. Montpellier, 1955.
52. - IRWING (C.W.), FRUTON (J.S.) et BERGMANN (M.)
Journ. Biol. Chem. 1941, 138, 231.
53. - JAVILLIER (M.) et COLIN (Y.) - Bull. Soc. Chim. Biol.
1933, 15, 1552.
54. - KNOWLES (F.) et WATKIN (J.E.) - Journ. Agri. Sci.,
1932, 22, 755.
55. - KOORSGAARD-CHRISTENSEN (L.) - Scand. Journ. Clin.
Lab. Invest. 1955, 7, 225.
56. - KUNITZ (M.) - Journ. Gen. Physiol., 1946, 30, 291.

57. - LAINE (T.) - Suomen Kemistilahti, 1943, 1, 7
58. - LEGRAND (P.) - Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1929.
59. - LINDERSTRÖM-LANG (K.) - Bull. Soc. Chim. Biol.,
1953, 35, 100.
60. - LOISELEUR (J.) - Techniques de laboratoire 1947 p. 297
Masson Edit.
61. - MERLEVEDE (E.), POTTIEZ (F.) et VERHELLE (O.) -
Arch. Int. Pharmacodyn., 1955, 3, 265.
62. - MISSON (G.) - Chem. Ztg. 1908, 32, 633.
63. - NEUBERG (C.) - Biochem. Ztschr., 1908, 9, 551, 557.
64. - NEUBERG (C.) et BRAHN (B.) - Biochem. Ztschr.,
1907, 5, 443.
65. - NORRIS (E.R.) et ELAM (D.W.) - Journ. Biol. Chem.,
1940, 134, 443.
66. - NORTHROP (J.H.) - Journ. Gen. Physiol., 1930, 13, 739.
67. - NORTHROP (J.H.) - Journ. Gen. Physiol., 1933, 16, 615.
68. - PLE (J.) - Thèse Doc. Univ. Pharm. Paris, 1929.
69. - POLONOVSKI (M.), BOULANGER (P.), MACHEBOEUF (M.),
ROCHE (J.) et SANNIE (C.) - Biochimie Médicale
1948 Masson Edit.
70. - POSTERNACK (S.) - Comp. Ren. Acad. Sci., 1903, 137, 337.
71. - RIGGS (B.C.) et STADIE (W.C.) - Journ. Biol. Chem.,
1943, 150, 463.
72. - SATO (M.S.) - Journ. Jap. Pharm. Soc. 1907 308,
d'après Pharm. Zeitung 1907, 98, 1022.
73. - STARKENSTEIN (E.) - Biochem. Ztschr., 1910, 30, 56.
74. - TAYLOR (W.H.) et O'BRIEN (J.R.P.) - Biochem. Journ.,
1956, 61, n° 1 Proceed.
75. - TOFFOLI (C.) et MARELLI (O.) - Rendic. Istit. Sup. Sanità,
1947, 10, 157.
76. - TOLCKMITT (W.) - Biochem. Ztschr., 1954, 325, 389.
77. - WORMSER (G.) - Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris 1955.

T A B L E D E S M A T I E R E S .

	Pages
INTRODUCTION	II
<u>PREMIERE PARTIE</u>	
CHAPITRE I. - Généralités sur la pepsine.	
A) - Origine	26
B) - Place de la pepsine dans la classification des enzymes	28
C) - Mode d'action	20
D) - Pepsine du Codex 1949	25
E) - Méthodes antérieures de mesure de l'activité	26
CHAPITRE II. - La pepsine du suc gastrique.	
A) - Généralités	31
B) - Dosage	33
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	
CHAPITRE I. - Utilisation de l'acide phytique pour insolubiliser les protéines non digérées par la pepsine.	
A) - Généralités sur l'acide phytique	37
B) - Action de l'acide phytique sur les protéines	41
C) - Choix d'un substrat : l'édestine	44
CHAPITRE II. - Essais préliminaires d'orientation.	
Vérification de la précipitation intégrale de l'édestine par l'acide phytique	47

CHAPITRE III. - Protocole opératoire des essais
systématiques.

A) - Réactifs employés	57
B) - Conditions de l'hydrolyse enzymatique	58
C) - Déterminations sur le précipité acide phytique-édestine	59
a) Détermination de l'azote total	60
b) Dosage du phosphore	60
c) Détermination de l'édestine non hydrolysée	60
D) - Déterminations sur le liquide surnageant.	
a) Dosage de la tyrosine	66
b) Dosage de l'acide phytique en excès ...	73
CHAPITRE IV. - Comparaison de l'évolution de la réaction suivant les différentes techniques	76
CHAPITRE V. - Etude de l'hydrolyse par la pepsine en fonction du temps	82
CHAPITRE VI. - Eléments de choix d'un protocole analytique.	93
Influence de la dose de pepsine sur la vitesse d'hydrolyse	94
Recherche de la cathepsine éventuel- lement associée à la pepsine	97
CHAPITRE VII. - Eléments de choix du mode d'expres- sion des résultats	113

TROISIEME PARTIE

Applications à la chimie clinique	118
CONCLUSIONS GENERALES	134
BIBLIOGRAPHIE	137

